ACADEMIE de PARIS

UNIVERSITE RENE DESCARTES

FACULTE DE MEDECINE

NECKER - ENFANTS - MALADES

Année 1973 N° 91

T H E S E

Pour le

D O C T O R A T E N M E D E C I N E

(Diplôme d'Etat)

par

CHABAUD Francis Gabriel

Né le 9 décembre 1946 à L'Aigle - Orne

Présentée et soutenue publiquement le 1973

Anticorps Anti Ag (β lipoprotéines)
Etude d'un sérum multispécifique
Fréquences de Ag (a1) et Ag (g)

Président : Monsieur SOULIER, Professeur

ACADEMIE de PARIS

UNIVERSITE RENE DESCARTES

FACULTE DE MEDECINE

NECKER - ENFANTS - MALADES

Année 1973 N°

T H E S E

Pour le

D O C T O R A T E N M E D E C I N E

(Diplôme d'Etat)

par

CHABAUD Francis Gabriel

Né le 9 décembre 1946 à L'Aigle - Orne

Présentée et soutenue publiquement le 1973

Anticorps Anti Ag (β lipoprotéines)

Etude d'un sérum multispécifique

Fréquences de Ag (a1) et Ag (g)

Président : Monsieur SOULIER, Professeur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ANTICORPS ANTI Ag (βlipoprotéines)

ETUDE D'UN SERUM MULTISPECIFIQUE

FREQUENCES DE Ag (a1) et Ag (g)

A ma famille

A mes amis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548022_0029

A Monsieur le Professeur J. P. Soulier, Directeur du Centre National de Transfusion sanguine de Paris qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse

A Monsieur le Docteur J. Moullec, Chef de Service au Centre National de Transfusion sanguine de Paris qui m'a inspiré le sujet de cette thèse et m'a permis de la réaliser

A Monsieur le Docteur M. Burstein, Chef de Service au Centre National de Transfusion sanguine de Paris qui m'a permis de me familiariser avec les techniques de préparation et de dosage des β lipoprotéines dans son laboratoire

A Monsieur R. Bütler, Laboratoire Central du Service de Transfusion Sanguine de la Croix Rouge de Berne, qui m'a permis de me familiariser avec les techniques d'hémagglutination passive dans son laboratoire et a bien voulu vérifier nos résultats

A Mademoiselle le Docteur Decarbonière, Chef de Laboratoire à l'Hotel Dieu de Paris

A Monsieur le Docteur Reviron, Directeur du poste de Transfusion Sanguine de l'Hôpital St Louis

A Madame J. Bourzeix

A Mademoiselle E. Brünner

A Monsieur M. Dubarry, Chercheur

A Mademoiselle Gouzi

A Madame Martin

A Monsieur et Madame Rychter

P L A N

INTRODUCTION

- PARTIE THEORIQUE

I - Méthodes d'étude

A) Introduction

B) Méthode d'hémagglutination passive et d'inhibition

1) Technique de Bütler

2) Technique de Boman

3) Conclusions et comparaisons entre techniques

C) Comparaison entre Hémagglutination passive et double diffusion en gélose

II - Description du système Ag

A) Les facteurs du système Ag

B) Hérédité du système Ag

C) Modèles immunogénétiques préposés

D) Les Anticorps Anti Ag

III - Conclusion

- TRAVAIL PERSONNEL

I - Dépistage d'Anticorps anti Ag

A) Matériel et Méthodes

B) Résultats

II - Etude d'un sérum anti Ag

A) Réactions sur le Panel

B) Epreuves d'inhibition de l'hémagglutination

1) Technique

2) Résultats

III - Fréquence des facteurs Ag (a1) et Ag (g)

A) Matériel et Méthodes

B) Résultats

IV - Test d'indépendance entre les facteurs Ag et les autres groupes sériques

CONCLUSION

INTRODUCTION

- Rappel historique

Les lipoprotéines sériques représentent un des groupes de protéines sériques parmi les plus complexes ; ce sont des complexes moléculaires formés par l'association de protéines et de lipides par des liaisons non covalentes.

Leur rôle principal est le transport des lipides dans le sang sous forme soluble.

Leur classification est basée essentiellement sur leur attitude en ultracentrifugation en gradient de densité, et secondairement, sur leurs propriétés électrophorétiques.

On trouvera les correspondances entre les deux nomenclatures sur le tableau 1.

TABLEAU 1

Poids moléculaire	Densité	Ultracentrifugation	Immunoélectrophorèse
$10^{10} - 10^{9}$	$<$ 0,95	chylomicrons	
$10^{8} - 10^{7}$	0,95 - 1,006	VLDL	Pre β lipoprotéines
$4 - 10^{6}$	1,006 - 1,063	LDL LDL 1 LDL 2	β lipoprotéines
$3 - 10^{5}$	1,2	HDL HDL 2 HDL 3	α lipoprotéines
	mg / ml		

Nomenclatures des lipoprotéines sériques humaines

Les LDL représentent donc un mélange hétérogène de lipoprotéines de densité allant de 1,006 à 1,063.

Les lipoprotéines contiennent d'autre part, des quantités importantes de protéines qui sont déterminantes pour les propriétés chimiques des complexes moléculaires (73). Des chylomicrons aux HDL, la proportion des lipides décroit alors que la proportion des protéines croit. Les peptides constitutifs des lipoprotéines sont appelés apolipoprotéines, ce sont eux qui par la régulation qu'ils subissent induisent la présence plus ou moins grande de lipoprotéines dans le sang. De plus, ils induisent la synthèse d'enzymes nécessaires au métabolisme des lipides dans le sens de la dégradation ou de la synthèse ; enfin, ces peptides supportent directement les déterminants antigéniques.

Ce qui va nous retenir particulièrement dans cette études, et que nous allons étudier maintenant, c'est l'étude des propriétés immunologiques des lipoprotéines, et particulièrement des lipoprotéines de faible densité, puisqu'à leur niveau, pour l'instant, ont été localisées presque toutes les propriétés antigéniques (sauf le système Va découvert grâce à l'isoprécipitine Anti HDL, et une partie du complexe Lp (a^+) qui est localisée au niveau des HDL).

- Historique de la découverte des propriétés immunologiques des lipoprotéines de basse densité.

Dans les dernières années des progrès considérables ont été réalisés dans l'étude de la variabilité d'origine génétique des β lipoprotéines du sérum humain.

Au moins deux systèmes génétiques non liés, les systèmes Ag et Lp ont été trouvés grâce à leurs propriétés antigéniques.

Allison et Blumberg en 1961 (1) découvrent dans un sérum de polytransfusé des isoprécipitines par la technique de double diffusion en gélose (84). Ce sérum qu'ils appelèrent C de B réagissait avec 51 % des sérums normaux dont l'Antigène fut appelé Ag (a). Ils ont montré que Ag (a) fait partie des lipoprotéines de faible densité.

Berg en 1963 (4) réalise l'hétéroimmunisation de lapins avec des β lipoprotéines provenant d'un seul individu. Après absorption appropriée par de la β lipoprotéine des anticorps non spécifiques, le sérum de lapin précipitait certains sérums humains normaux, mais non tous.

L'antigène qui a été ainsi révélé dans ces sérums par double diffusion en gélose fut appelé Lp (a). L'Anticorps est le premier anticorps de groupe sérique humain produit par immunisation animale.

Il a été démontré par la suite que ces deux systèmes sont différents, à la fois par leurs caractères immunologiques et par leurs caractères génétiques :

- Par leurs caractères immunologiques :

D'une part, par le mode de production des anticorps. Il s'agit d'allo-anticorps de polytransfusés pour le système Ag, et d'hétéro-anticorps (de lapin) pour le système Lp. Depuis, il a toujours été impossible d'obtenir des anticorps de groupe Ag ou Lp par des moyens différents.

D'autre part, il n'y a pas de réactions d'identité antigénique entre les facteurs Ag et Lp à l'Ouchterlony (4).

- Par leurs caractères génétiques :

Les systèmes Ag et Lp ne présentent pas de liaison génétique. D'autre part, ce sont des complexes lipoprotéiques différents qui supportent les déterminants des deux systèmes.

Récemment, on a isolé le complexe portant la spécificité Lp (a +) ; le déterminant Lp (a) est porté par une glycoprotéine qui peut se détacher du complexe sans perdre sa spécificité. Dans cette étude, nous nous intéresserons exclusivement au système Ag.

PARTIE THEORIQUE

I - METHODE D'ETUDE

A) Introduction

Deux sortes de techniques sont appliquées pour la détection des anticorps et le typage des sérums : la double diffusion en gel d'agar et l'hémagglutination passive.

En gel d'agar, entre le réservoir du sérum dans lequel on recherche les anticorps et ceux des sérums utilisés comme "panel", il se produit un précipité quand le sérum étudié contient un anticorps correspondant à l'un des facteurs contenus dans les sérums du Panel.

Pour détecter un facteur Ag dans un sérum quelconque, on mélange un peu de ce sérum avec un Antisérum spécifique du facteur recherché. En gel d'agar, si le sérum examiné contient le facteur en présence, l'antisérum ne précipite plus avec les sérums contenant ce facteur.

Dans la technique d'hémagglutination passive, on fixe sur des globules rouges de la LDL purifiée choisie parce qu'elle porte tel ou tel facteur Ag ; des Antisérums contenant des anticorps contre ce facteur agglutinent ces globules rouges.

Pour détecter un facteur Ag dans un sérum quelconque, on mélange un peu de ce sérum avec un Antisérum spécifique du facteur recherché ; si le sérum étudié contient le facteur en question, l'Antisérum n'agglutine plus ces globules rouges. Diverses modalités techniques ont été décrites

pour la double diffusion en gel d'agar (84, 61, 8).

La comparaison des deux techniques a montré que la sensibilité de l'hémagglutination passive est supérieure à celle de la précipitation pour la détection des Anticorps, tout en étant aussi fidèle pour la détermination des groupes (39, 16) ainsi qu'il sera montré par la suite. Nous l'avons utilisée exclusivement et c'est d'elle qu'il va être question.

B) Méthodes d'hémagglutination passive et d'inhibition d'hémagglutination passive

Principe :

Cette méthode a été décrite par Bütler en 1966 (37). Elle est basée sur la propriété découverte par Beaumont (3) que les LDL peuvent être fixés aux erythrocytes par diazotation.

Cette méthode offre la possibilité de chercher des anticorps anti LDL non précipitants dans les sérums des malades polytransfusés. Bütler et Brunner ont décrit le premier sérum non précipitant en 1967 (40).

Elle a également le très grand avantage de permettre, par la technique d'inhibition d'hémagglutination de rendre des antisérums qui sont polyspécifiques, monospécifiques, si l'on dispose des préparations de LDL convenables.

En 1970, Boman a fait une étude critique des différents facteurs de variation de cette méthode et a proposé une standardisation, de manière à obtenir la spécificité et

la sensibilité optimale (15).

1) Technique de Bütler (39)

a - Réactifs :

- Tampon phosphate PH 7,3 : 0,15 M.
- Diluant : une solution de protéines (PPL II de la Croix-Rouge Suisse) à 1 % dans le tampon.
- Stock de solution de BBD :

- Solution A : 0,46 g de benzidine purifiée sont dissous dans une solution de 82 ml d'eau distillée et de 18 ml d'HCL concentré. La solution est placée sous agitation à 0° C, jusqu'à ce que un volumineux précipité de benzidine se soit formé.

- Solution B : 0,35 g de Na NO_2 sont mis dans à peu près 0,5 ml d'eau distillée : la solution B est ajoutée goutte à goutte, et sous agitation constante à la solution A froide ; l'agitation à 4° est continue jusqu'à ce que la solution soit claire (à peu près 15 mn), on met alors rapidement la solution obtenue en tubes par fractions de 0,5 ml, ces tubes sont mis à la congélation à - 20° C.

- Solution de BBD de travail : à préparer extemporairement : 0,2 ml du stock sont dilués dans 2,8 ml de tampon phosphate froid à PH 7,3.
- Solution saline de densité 1,11 : à 170 g de Na Cl pour analyse, on ajoute de

l'eau distillée jusqu'à 1 000 ml.

- Solution de LDL (préparée par ultracentrifugation) :

Le sérum est centrifugé à 30 000 rpm pendant 30 mn (Spinco rotor 30. 2,9 ml de sérum par tube de 10,5 ml) les chylomicrons sont ensuite éliminés par succion.

Des échantillons de 5 ml de sérum sont alors mélangés à 4 ml de solution saline de densité 1,11 (ce qui donne une densité finale de 1,019 à 1,063) (correction de la technique initiale qui utilisait les lipoprotéines de la classe 1,006 à 1,063) et centrifugés à 30 000 rpm pendant 16 h (approximativement 80 000 g) les LDL flottants à la surface peuvent être aspirés par un tube capillaire. La préparation de LDL est dialysée contre du sérum physiologique pendant 24 heures.

- Dosage des LDL ainsi préparés : Technique de Berg (6)

Détermination du coëfficient d'extinction à 280 m μ au spectrophotomètre Jobin.

L'établissement d'une courbe donne le coëfficient d'extinction en fonction de la concentration de LDL en g %. Il existe des solutions commerciales de LDL à 2 % pour établir la courbe étalon (2 % Behringwerke, Marburg, Lahn).

b - Méthodes :

- Couplage des globules rouges avec les LDL : Des Erythrocytes humains de groupe O recueillis récemment sont lavés trois fois dans du sérum physiologique, et une suspension à 50 % est préparée, la solution de LDL en quantité corres-

pondant à 3 mg de LDL est ajoutée à 0,1 ml de la suspension d'érythrocytes. Le volume est amené à 3 ml avec du tampon phosphate froid. La suspension est mise à 0° et mélangée avec 0,25 ml de BDB solution (préparée extemporanement), le couplage a lieu à la température de la pièce pendant 60 mn. La solution de LDL globules rouges est alors centrifugée pendant 5 mn et lavée deux fois avec du tampon phosphate. Une suspension à 2 % dans le diluant est alors préparée.

- Détection des anticorps anti LDL en hémagglutination passive :

A 0,05 ml de la suspension globules rouges couplés, 0,1 ml de sérum anti Ag est ajouté (Sérum inactivé à 56° pendant 30 mn). Des microplaques sont utilisées pour cela, le mélange est agité pendant quelques minutes et gardé à 4°. La première lecture a lieu au bout de 2 heures, et la seconde après 20 heures.

Pour le titrage des anticorps anti LDL, des séries de dilutions du sérum anti Ag sont faites avec le diluant et mélangées avec la quantité standard de globules rouges couplés.

Comme contrôle négatif, un mélange de sérums inactivés normaux est utilisé.

Comme contrôle positif, un immun sérum anti LDL de lapin préabsorbé avec des globules rouges est utilisé.

- Détection des facteurs Ag par la technique d'inhibition d'hémagglutination :

Sérum Anti Ag et sérums normaux inhibiteurs sont inactivés (30' à 56°) et dilués avec du diluant, des fractions de 0,05 ml de sérum anti Ag dilué, sérums normaux (dilués ou non) et de suspension de globules rouges revêtus de LDL

sont mélangés sur les microplaques.

Après agitation pendant quelques minutes, ils sont placés à 4°. La première lecture est faite après deux heures, une seconde lecture au bout de 20 heures.

2) Technique de Boman (15)

a - Réactifs :

- Tampon phosphate PH 7,3 : 0,15 M.
- Diluant : Le diluant employé pour la plupart des expériences a la composition suivante :

. Bovine Sérum Albumin	2	g
. Dextrose	28	g
. Merthiolate	0,1	g
. Tampon PH 7,3	250	ml
. Na Cl à 0,85 %	250	ml
. Eau distillée jusqu'à	1 000	ml.

Dans des études comparatives, on a utilisé aussi :

. Tampon phosphate PH 7,3 avec 0,2 % Albumine bovine ou 1 % sérum de lapin normal absorbé ou 1 % de la solution protéique de plasma humain normal utilisée par Bütler.

- Solution Stock de BBD : La benzidine bis diazotée préparée selon la méthode de Kabat et Mayer (72) avec des légères modifications.

Au lieu de Benzidine, Benzidine hypochloride (E Merck Ag Darmstadt) utilisée. Benzidine hypochloride 0,642 g est dissout dans 95 ml d'HCL dilué (3 ml d'HCL 6 N et 92 ml d'eau

distillée) et le mélange est refroidi à 7 - 8° dans un bain d'eau. Du Na NO_2 récemment dissout (0,35 g dans 5 ml d'eau distillée), est rafraichi dans le même bain d'eau, et ajouté lentement goutte à goutte, sous constante agitation, à la solution de benzidine.

On laisse la réaction se dérouler pendant 30 mn (au bout de ce temps, on ne trouve plus de nitrite libre réagissant avec l'iodure de potassium. La benzidine bis diazotée est alors rapidement congelée en portions de 0,5 ml chacune sur un bain d'Acétone solidifiée et conservée à 28°.

- Solution de BBD de travail : Immédiatement avant l'usage, les réactifs sont dilués au 1/15 et mélangés dans le tampon phosphate à 4° C.
- Solution de LDL : Boman a employé deux techniques pour préparer les LDL : chromatographie sur hydroxylapatite (Hyerten (60)) et ultracentrifugation.
- Dosage des LDL : Ce dosage a été réalisé au spectrophotomètre selon la technique de Berg (6), et par immunodiffusion (75).
- Suspension globulaires : Erythrocytes du groupe O, Sang recueilli en parties égales sur une solution de Alsever modifié (96) et gardé à 4°, les globules sont utilisés pendant une semaine (il n'a été trouvé aucune différence dans les titres obtenus[31] les globules rouges sont gardés trois jours à 4°), les cellules de plus de 50 donneurs différents ont été utilisées successivement, sans différence dans les titres.

Le culot d'hématies est lavé trois fois dans 15 fois son volume de solution saline à 0,85 %.
Le culot est alors remis en suspension dans un volume égal de solution saline.
Le contenu en hémoglobine de cette suspension mesuré au spectrophotomètre Beckman modèle DB-G selon la méthode de Jacobs et Lunde (71) est ajusté à 14,8 g ($\pm$ 0,5 g) d'Hb/100 ml.
Dans quelques expériences des hématies humaines du groupe O traitées au formol furent utilisées.
La méthode de Czizmas (52) avec les modifications de Godal (56) fut employée et la concentration finale de Formaldehide était 5 ou 10 %.
La concentration des hématies traitées fut déterminée de manière spectrophotométrique et ajustée à 50 %.

b - Méthodes :

- Couplage : Le procédé décrit par Stavitsky et Arquilla (91) est suivi avec quelques modifications. La sensibilisation fut réalisée dans des tubes à centrifugation de 10 ml. L'antigène (β lipoprotéine en quantité de moins de 1 à 9 mg dans 0,2 à 2,5 ml solution saline) est dilué à 3 ml avec du tampon phosphate PH 7,3, à la solution diluée d'antigène 100 ml de suspension d'érythrocyte est ajoutée, puis 0,3 ml de solution BBD est ajoutée immédiatement après la préparation.
  La réaction de couplage se fait à la température de la pièce pendant 45 minutes, sous légère agitation constante, pour

empêcher les cellules de déposer dans le tube. Une agitation intermittante à la main a été trouvée également efficace.

A la fin du temps de couplage, les hématies sensibilisées sont centrifugées (350 g - une minute) et le surnageant écarté. Les cellules sensibilisées sont lavées et remises en suspension 3 fois dans 2,5 ml de diluant. Généralement, les hématies sont utilisées immédiatement après préparation.

Des dilutions successives par 4 des antisérums dans le diluant sont faites.

- Détection des anticorps : Le sérum humain normal sert de témoin négatif.

A chaque tube contenant 0,5 ml de l'antisérum dilué est ajouté une goutte (0,05 ml) de la suspension de cellules sensibilisées.

Les tubes sont agités et laissés à 4° pour que les hématies déposent. Les lectures ont lieu au bout de 3 heures et le jour suivant. La dernière lecture est considérée comme décisive, l'inverse de la plus grande dilution d'antisérum donnant une réaction positive est considérée comme étant le titre de l'antisérum.

Les résultats sont lus comme suit :

+ + +	lisse mat avec bords éversés
+ +	lisse mat avec bords irréguliers
+	lisse mat avec ou sans anneau circonférentiel
±	surface couverte plus petite que + et anneau plus marqué autour des bords
-	de 2 sortes : anneau étroit si cellules sen-

sibilisées

petit bouton si cellules non sensibilisées.

- Inhibition d'hémagglutination : On la réalise en ajoutant du sérum ou des β lipoprotéines à l'antisérum avant que les cellules sensibilisées ne soient ajoutées. Les résultats obtenus avec du sérum inhibiteur non dilué, ajouté à chaque tube ne sont pas toujours aussi nets que ceux obtenus avec du sérum dilué.

Les sérums dont la capacité d'inhibition doit être testée, sont donc dilués au 1/20 dans le diluant et 0,03 ml du sérum dilué est ajouté à 0,5 ml de l'antisérum dilué.

Après mélange, les hématies sensibilisées sont ajoutées, la concentration d'antisérum utilisée pour le groupage est généralement 4 fois plus grande que celle du dernier tube positif dans l'expérience avec dilution de l'Antisérum.

Contrôles : Des réactions claires négatives sont demandées :

Dans toutes les expériences : - Cellules sensibilisées dans le diluant + sérum humain normal aux mêmes dilutions que l'antisérum.

- Cellules sensibilisées dans le diluant + sérum de lapin anti β lipoprotéines.
- Cellules non sensibilisées + dilution de l'antisérum et diluant.

En inhibition d'hémagglutination : - Cellules non sensibili-

sées dans le sérum inhibiteur dilué.

- Sérums positifs et négatifs pour les antigènes β lipoprotéiques révélés par l'iso-antisérum humain.

c - Facteurs influençant la réaction d'hémagglutination :

Boman a fait une étude très complète en faisant varier un seul facteur à la fois, les autres restant constants.

Les tableaux (2, 3, 4) résument les principaux résultats obtenus.

TABLEAU 2

Quantité de β lipoprotéines	Optimum : non congelées 3 - 9 mg congelées 0,65 - 4 mg
Quantité de BBD	Optimum : 0,3 ml (avec 0,1 ml d'hématies et 0,65 ml de β lipoprotéines)
Volume d'hématies	0,05 à 0,10 ml de suspension à 2 % d'hématies normales ; médiocres résultats des hématies formolées.
Temps de couplage	Optimum : 45 minutes à 24° C
P H	Optimum : 7,2 à 7,8
Hémoglobine	Entre en compétition avec le β lipoprotéine, de même que l'albumine, etc., d'où titres inférieurs.
Réutilisation des β lipoprotéines	Le surnageant, après sensibilisation des globules rouges, n'est pas ré-utilisable.

Facteurs influençant le couplage.

TABLEAU 3

Diluants	Optimum : PPL 1 %, albumine bovine 0,2 % dans la solution de dextrose - Na Cl. Titre augmenté de 2 à 6 fois par le dextrose - P H entre 6,8 et 7,8.
Temps et température de réaction	Lisible après : - 20 h à 24° C - 48 h à 4° C
Influence du chauffage des antisérums 30 mn à 56° C	Résultats équivalents avec sérums chauffés ou non.
Contamination bactérienne	Des antisérums ou du diluant : peut donner de fausses réactions positives (ajouter du merthiolate au diluant).

Facteurs influençant l'agglutination.

TABLEAU 4

Protéines autres que β lipoprotéines	Non inhibitrices, en particulier PPL
β lipoprotéines de divers types génétiques	Spécificité bien tranchée de l'inhibition. 0,03 ml de dilution à 1/20 de sérum humain homologue est inhibiteur. Le sérum pur ne l'est pas.
Temps nécessaire pour l'inhibition	L'inhibition est détectée dès les premières minutes après le mélange.
Effet du chauffage	Le sérum chauffé ou non à 56° C reste inhibiteur.
Stabilité de Ag	Beaucoup plus grande que celle de Lp

Facteurs influençant l'inhibition d'hémagglutination.

3) Conclusions sur les techniques d'hémagglutination et comparaison entre les techniques employées par Bütler et Boman

L'étude méthodologique détaillée par Boman met en évidence l'utilité d'une standardisation soigneuse de toutes les étapes et de tous les réactifs si l'on veut

obtenir des résultats reproductibles.

Les principales difficultés rencontrées sont les suivantes :

1. Le manque de stabilité des β lipoprotéines à des congélations et des décongélations successives, ceci pouvant être diminué selon Boman par adjonction de 0,1 % W/V EDTA à la solution saline utilisée pour la dialyse.

De plus, une quantité fixe de β lipoprotéines donne des titres extrèmement différents selon les préparations (ceci étant semble-t-il indépendant de la technique de préparation employée chromatographie ou ultracentrifugation) Bütler et Coll. expliquent cela par l'hétérogénéité en contenu d'antigène des différentes préparations ; quoi qu'il en soit, la conclusion de ceci est que l'on doit à chaque nouvelle préparation de β lipoprotéines faire un titrage avec un antisérum de référence, de manière à obtenir les concentrations optimum en β lipoprotéines de chaque préparation (il semble que la concentration optimum d'une préparation donnée de β lipoprotéines soit la même quelque qoit l'antisérum employé).

2. Une autre cause de manque de reproductibilité d'après Stavitsky (92) pourrait venir des altérations des hématies pendant le stockage et des différences entre les hématies des différents donneurs, ceci n'a pas été retrouvé par Boman, qui pense que les hématies de n'importe quel donneur O peuvent être utilisées, et même stockées dans une solution de Alsever modifiée : dans tous les cas, ainsi que

le suggère Stavitsky (90) il met dans le diluant de l'albumine bovine à 0,2 % pour réduire l'hémolyse, et également du Dextrose qui a pour effet, à la fois de diminuer l'hémolyse spontanée et d'augmenter le titre de 2 à 4 fois par rapport aux diluants sans Dextrose.

3. Enfin pour avoir une bonne reproductibilité, il faut utiliser une quantité standard de globules sensibilisés pour chaque test.

4. Tous les facteurs augmentant la sensibilité ont été vus en détail précédemment.

Les différences principales entre les techniques d'hémagglutination de Bütler et celle de Boman sont les suivantes : (Bütler (39) - Boman (15))

1. Emploi par Boman d'un "titre standard" déterminé par un antisérum de référence (humain ou de lapin) pour déterminer la quantité optimum d'une solution de β lipoprotéines.

Bütler et coll. employèrent une quantité standard de 3 mg de β lipoprotéines pour toutes les préparations.

2. Boman fait des dilutions d'antisérum par 4, alors que Bütler dilue d'un facteur 2 à chaque fois.

3. Boman dilue ses antisérums dans 0,5 ml et obtient des titres de l'ordre de 51 200 avec son sérum anti Lt (a).

Bütler dilue ses antisérums dans 0,1 ml et obtient des titres de l'ordre de 1 000 avec son sérum précipitant Gi (anti Ag (x)).

4. La BBD utilisée par Bütler et coll. diffère du réactif employé par Boman principalement dans la quantité d'acide hydrochlorique utilisée.

5. Le PH du tampon phosphate servant au couplage est de 7,1 ou moins, dépendant de la quantité du tampon présent.

Le PH est 7,2 ou plus dans les mélanges de couplage de Boman.

Ces différences semblent s'être répercutées dans les résultats qu'ils ont obtenus, dans leurs dépistages ultérieurs.

Il faut noter bien entendu, que les résultats de Boman sur la reproductibilité et la sensibilité optimum, dans des conditions standardisées, ne peuvent être extrapolés puisqu'ils ont été établis dans des conditions expérimentales très précises, et que ces conditions ne seront pas forcément les meilleures avec une méthodologie un peu différente, comme celle de Bütler et coll.

Résultats différents pour le dépistage :

Bütler et Brunner (1969) : 47 sérums de thalassémiques donnent 3 sérums monospécifiques non précipitants.

Boman (1972) : 39 sérums thalassémiques donnent 12 sérums contenant 20 anticorps non précipitants.

Explications possibles :

1. Différence entre les deux séries de patients, Italiens et Américains.

2. Différences dans les méthodes d'étude : Boman ajuste les conditions dans les procédés de couplage de manière

à avoir des préparations de globules rouges couplés donnant des titres élevés standards, contre les antisérums de référence (Boman 1971).

De plus, il teste le sérum des patients à 4 dilutions, contre au moins 12 β lipoprotéines couplées, pour éviter un phénomène de prezone et pour réduire le risque de non détection d'anticorps révélant des antigènes rares.

Le nombre de préparations couplées utilisées n'est pas indiqué par Bütler (1969).

De plus, Bütler et Brunner (1969) ont trouvé deux anti Ag (e) dont la spécificité est parentè du groupe A et également des hémagglutinines résistantes à la neutralisation dans les expériences d'inhibition.

Boman n'a pas obtenu ces résultats dans ses expériences par sa technique modifiée.

C) Comparaison des méthodes d'hémagglutination et de double diffusion en gélose

Bütler et coll. (39), puis Boman (16) ont fait une étude comparative des méthodes d'hémagglutination et d'immuno-diffusion. Ils ont constaté que la méthode d'hémagglutination est plus sensible que celle d'immuno-diffusion et qu'elle permet de détecter tous les anticorps mis en évidence par celle-ci, plus une importante proportion d'anticorps non-précipitants. Pour la mise en évidence des antigènes, par inhibition de l'agglutination, elle est fidèle et reproductible.

Un avantage très important de cette méthode est qu'elle permet, du fait de sa sensibilité, de réduire d'une façon considérable (environ 25 fois) la consommation d'antisérums pour la détermination des groupes Ag.

Un autre avantage est la possibilité d'utiliser des antisérums polyspécifiques pour déterminer un seul groupe Ag si l'on possède des préparations de β lipoprotéines ne possédant qu'une spécificité antigène correspondant à un seul des anticorps des antisérums.

Ceci permet d'éviter l'opération d'absoption préalable des antisérums, qui est une opération délicate.

Les limites de la méthode d'hémagglutination ont été étudiées par Stavitsky (92) et Boman (15) celui-ci a insisté sur la standardisation nécessaire des conditions de la méthode, pour obtenir une sensibilité et reproductibilité maximum.

En particulier, il est important d'après lui de faire toujours un titrage préalable des β lipoprotéines, afin de déterminer la quantité optimum à employer pour le couplage. Cet optimum variant à la fois selon les préparations et dans le temps.

Il insiste aussi sur la nécessité d'employer une quantité standard de globules sensibilisés pour chaque tube test.

En conclusion, on peut dire que si la méthode de double diffusion en agar reste la méthode de référence, la technique d'hémagglutination passive est actuellement bien au point pour la mise en évidence du polymorphisme génétique des β lipoprotéines, cette méthode est intéressante, principale-

ment pour sa sensibilité et son économie et sa possibilité d'étude d'anticorps faibles non précipitants.

II - DESCRIPTION DU SYSTEME AG

A) Les facteurs du Système Ag

Chez l'homme, les différences sérologiques du sérum révélées par iso-immunisation ont été décrites depuis longtemps. En 1916, Marie trouva deux malades qui après injection intraveineuse de sérum humain formaient des précipitines, réagissant avec le sérum du donneur et avec le sérum de certains autres individus (76).

En 1929, György et Witebsky trouvent aussi le complément fixant les anticorps contre les protéines de sérum de donneur chez un homme polytransfusé (58).

En 1961, Allison et Blumberg ont redécouvert la propriété des individus polytransfusés à former dans certaines conditions, des isoprécipitines contre les protéiques sériques du donneur (1).

Utilisant une technique de diffusion en gel, ils trouvent un nouveau système de protéines sériques chez l'homme caractérisé par la propriété de certains, mais non de tous les sérums humains de donneur des précipités en gel d'agar contre le sérum d'un individu polytransfusé (sérum C de B). Ce nouveau polymorphisme du sérum fut appelé le système Ag et fut principalement attribué aux allotypes de la α_2 macroglobuline (1). Par la suite, il fut trouvé que les antigènes ou déterminants antigéniques, contre lesquels les isoprécipitines sont formées, sont localisés aux lipoprotéines de basse den-

sité (22).

L'Antigène ainsi détecté a été appelé Ag (a). Mais le sérum anti Ag (a) contenait en réalité plusieurs anticorps, comme cela arrive souvent dans ce système. Actuellement la même technique et celle plus récente de l'hémagglutination passive, ont permis de trouver un grand nombre d'autres antisérums dont l'analyse a révélé que le système Ag est très complexe. On a individualisé successivement une série de déterminants antigéniques dont la liste est donnée dans le tableau 5 (47).

TABLEAU 5

Facteur Ag	Auteurs	Références
Ag (x)	Hirschfeld et Blumberg	(62) 1964
Ag (a1)	Hirschfeld et Coll.	(63) 1964
Ag (z)	Hirschfeld et Coll.	(63) 1964
Ag (†)	Hirschfeld et Coll.	(64) 1966
Ag (y)	Contu	(49) 1966
	Hirschfeld	(64) 1966
	Okochi	(83) 1967
Ag (c)	Bütler	(40) 1967
Ag (m)	Contu	(50) 1968
Ag (g)	Bütler	(44) 1970
Ag (d)	Bütler	(45) 1970
Ag (h)	Bütler	(48) 1973

Principaux facteurs du groupe Ag connus, dates de découverte et références.

Ce tableau ne contient pas le facteur Ag (a) qui avait été décrit à l'origine, pour la raison qui vient d'être donnée.

La spécificité Ag (b) mal définie ne figure plus dans la nomenclature. De même le facteur Ag (e) n'a pas été mentionné puisqu'il a été démontré qu'il s'agissait proba-

blement d'un antigène apparenté à l'antigène A (46).

D'après les résultats observés en génétique formelle (familles et populations), tous ces facteurs s'intègrent à un modèle génétique cohérent, sauf Ag (m) et Ag (h) dont on sait simplement qu'ils sont étroitement liés au système (50, 48).

On n'a pas mentionné les facteurs trouvés par Berg, Ld (a), Lt et par Boman (HSH) car leurs relations avec le système Ag ne sont pas encore connues avec certitude.

Berg en 1970 (10) a distingué 4 groupes parmi les spécificités anticorps, selon la ressemblance plus ou moins grande des réactions des antisérums avec 58 sérums de donneurs sains (dans des comparaisons deux à deux).
Il a défini ainsi les groupes Ld, Ag, Lt, Lp.

Bütler a critiqué l'appellation facteur Ld, car il pensait que logiquement, il faudrait le nommer facteur Ag, du fait qu'il a été mis en évidence par des polytransfusés.

Le facteur HSH trouvé par Boman (18) appartiendrait peut-être au système Ag.

Les Anticorps Anti Ag, bien qu'on en connaisse déjà un bon nombre, sont rares. Ils ne se développent qu'après de nombreuses transfusions, et ne paraissent avoir une fréquence relativement grande dans ces conditions que dans une catégorie très particulière de malades, les enfants atteints de thalassémie majeure.

Les 8 facteurs découverts donnent lieu à un grand nombre de phénotypes. Ainsi Bütler en 1971 (47), sur un panel de 238 sérums a observé les proportions de phénotype pour

8 facteurs Ag indiquées dans le tableau 6.

Ces fréquences varient suivant les populations et ont été étudiées par différents auteurs, particulièrement en ce qui concerne Ag (x) (77, 88, 61, 78, 83, 13, 85) et plus récemment d'autres facteurs Ag (67, 47, 10).

Récemment Brad-Brook (28) a appliqué l'étude des facteurs Ag (x) et Ag (y) aux études de paternité et a trouvé une bonne concordance avec les autres marqueurs génétiques.

Il semble que les antigènes du groupe LDL soient détectables dès la naissance (78 bis).

TABLEAU 6

Réactions avec Anti Ag									
x	y	a1	d	c	g	t	z	Nombre	%
-	+	-	+	-	+	+	-	10	4,2
-	+	-	+	+	+	+	-	32	13,45
-	+	-	+	+	-	+	-	16	6,72
-	+	+	-	-	+	-	+	7	2,94
-	+	+	-	-	+	+	+	12	5,04
-	+	+	+	-	+	+	-	12	5,04
-	+	+	+	-	+	+	+	13	5,46
-	+	+	-	+	+	+	+	1	0,42
-	+	+	+	+	-	+	+	1	0,42
+	+	+	-	-	+	+	-	6	2,52
+	+	+	-	-	+	+	+	18	7,56
+	+	-	+	-	+	+	-	2	0,84
+	-	+	-	-	+	+	-	9	3,78
+	-	+	+	-	+	+	-	1	0,42
-	+	+	+	+	+	+	-	11	4,62
-	+	+	+	+	+	+	+	30	12,61
+	+	+	+	-	+	+	-	24	10,09
+	+	+	+	+	+	+	-	32	13,45
+	+	+	+	+	+	+	+	1	0,42
Totaux								238	100

Proportion des différents phenotypes pour 8 facteurs du groupe Ag (d'après une étude faite sur 238 sérums de donneurs de Berne).

B) Etude de l'hérédité du système Ag

Si l'on considère par exemple les 5 facteurs Ag (a1, x, y, z, t) dont Hirschfeld (67) avait estimé la fréquence sur un panel de 462 sérums (tableau 7).

TABLEAU 7

Groupes	Nombres	%
1. Ag (x+ y+ a1+ z+ t+)	34	7,4
2. Ag (x+ y+ a1+ z+ t-)	3	0,6
3. Ag (x+ y+ a1+ z- t+)	111	24,0
4. Ag (x+ y+ a1+ z- t-)	2	0,4
5. Ag (x+ y+ a - z- t+)	10	2,2
6. Ag (x+ y- a + z+ t+)	1	0,2
7. Ag (x+ y- a + z- t+)	23	5,0
8. Ag (x- y+ a + z+ t+)	78	16,9
9. Ag (x- y+ a + z+ t-)	16	3,5
10. Ag (x- y+ a + z- t+)	52	11,3
11. Ag (x- y+ a + z- t-)	2	0,4
12. Ag (x- y+ a - z- t+)	128	27,7
13. Ag (x- y+ a - z- t-)	2	0,4

Pourcentage des phénotypes Ag de 462 sérums de donneurs suédois

Si nous supposons que ces facteurs sont indépendants, ils peuvent, en principe, former 32 combinaisons,

En fait, nous voyons d'emblée que les facteurs ne se répartissent pas au hasard l'un par rapport à l'autre. Il n'y a que 13 combinaisons. De même, Bütler, en 1971, (47) sur un panel de 238 sérums et pour 8 facteurs Ag n'a observé que 19 combinaisons parmi 81 phénotypes théoriquement possibles. (tableau 3)

Par exemple pour Ag (x) Ag (y) Hirschfeld (67) a observé les proportions suivantes :

- Ag (x+ y-) 5,2 %
- Ag (x+ y+) 34,6 %
- Ag (x- y+) 60,2 %
- Ag (x- y-) 0 %.

Nous voyons que les fréquences des combinaisons de x et y sont très proches des fréquences d'équilibre, dans l'hypothèse d'allélisme et de codominance de x et y.
Il y a absence de x- y- ce qui est compatible avec cette hypothèse. De nombreux travaux de différents auteurs concluent que les gènes Ag^{x} et Ag^{y} se comportent comme des allèles codominants (65, 66, 67, 83, 78). Hirschfeld, par des études de famille (67, 68) a trouvé que le gène Ag^{a1} était étroitement lié au locus $Ag^{x/y}$, ceci a été confirmé par Morganti et Coll. (79).

Il a été démontré par Morganti et Coll. (81) que Ag^{d} est un allèle codominant de Ag^{a1} grâce à une étude de 20 familles critiques, avec au total 100 enfants, aucune exception à cette hypothèse ne fut observée.

Une étude de 21 familles critiques, ayant 105 enfants permit de vérifier que Ag^{c} et Ag^{g} étaient aussi

allèles codominants (81). Aucune exception à cette hypothèse ne fut observée.

En 1969, Hirschfeld et Rittner (68) ont étudié l'hérédité de ces facteurs dans 75 familles et ont montré que les gènes produisant Ag (a1), Ag (z) et Ag (t) sont étroitement liés à ceux du locus Ag $^{x/y}$, ils n'ont pas observé de recombinaisons. Morganti et Coll. ont montré que le locus Ag $^{c/g}$ est étroitement lié au locus Ag $^{x/y}$ et Ag $^{a1/d}$ respectivement (82).

Les facteurs Ag (t) et Ag (z) d'après les recherches d'Hirschfeld étaient contrôlés par une paire d'allèles codominants (67). Cette hypothèse fut confirmée par Bütler d'après une étude de fréquence des phénotypes Ag (t, z) sur un échantillon de 238 individus.

Morganti et Coll. (47) ont également montré récemment que Ag $^{t/z}$ était lié étroitement aux loci Ag $^{x/y}$, Ag $^{a1/d}$ et Ag $^{c/g}$ respectivement (82) d'après une étude de 238 phénotypes.

Pour le facteur Ag (h) découvert tout récemment (48) bien que des relations d'allélisme avec les autres facteurs n'aient pas encore été trouvé, il a déjà été montré sur une étude de 29 familles, comprenant 147 enfants, que Ag (h) se transmet selon le mode dominant, et également d'après une étude de fréquence phénotypique que Ag (h) est génétiquement lié aux autres facteurs du système Ag (48). Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour conclure.

Certains auteurs ont trouvé des exceptions au postulat du mode de transmission dominant pour le système Ag.

Ainsi Okochi (83) trouve 10 % d'enfants Ag (x+) de parents Ag (x-) et également des exceptions à l'allélisme entre Ag ^{x} et Ag ^{y}. Ces exceptions restent très limitées, par rapport à l'ensemble des études génétiques qui ont été menées.

Pour les facteurs Ag (m) et Ag (h), on ne possède pas suffisamment de données pour les situer précisément par rapport au modèle existant.

Seuls Ag (m+ x+) et Ag (m- x-) ont été observés jusqu'à présent et Morganti et Bütler (81) pensent qu'il s'agirait d'une substructure de Ag (x).

Des études complémentaires sont nécessaires pour pouvoir affirmer les relations génétiques entre m et les autres facteurs du système Ag.

En 1964, Berg (7) a montré que les systèmes Ag et Lp sont complètement indépendants génétiquement et appartiennent à des populations de molécules lipoprotéiques différentes.

Morganti et Coll., en 1968, (80) ont étudié les relations entre le système Ag $^{x/y}$ et MN, ABO, Ss, P, Rh, Kell, Duffy, Gm, Inv, Hp, Gc, ils n'ont pas mis en évidence d'association, ni de linkage entre ces facteurs. De même une étude de 100 familles suédoises comportant 238 enfants a été faite pour étudier la ségrégation et le linkage de 12 systèmes de groupes sanguins et sériques (59 bis). Elle a confirmé les résultats de Morganti et Coll. sauf pour Ag et Gc pour lesquels une forte suspicion de linkage a été trouvée. Des études supplémentaires seront nécessaires pour éclaircir ce point.

Morganti et Coll. (80 bis) ont cherché une asso-

ciation entre le système Ag $^{x/y}$ et la thalassémie en comparant les fréquences chez 90 thalassémiques et 90 sujets témoins normaux. Ils n'ont pas trouvé d'association et de linkage (par la méthode de Morton) entre la thalassémie et le système Ag.

L'antigène Australia découvert lors d'une recherche d'anticorps de type anti Ag par Blumberg et Coll. en 1965 (27 bis) n'a pas de rapport non plus avec le système Ag.

C) Modèles immunogénétiques proposés pour expliquer les relations des facteurs Ag entre eux

Plusieurs sortes de modèles peuvent théoriquement expliquer ce qui est observé (69) :

- ou bien le sérum immun est spécifique simple, et on a un complexe antigène : c'est le modèle simple complexe ;
- ou bien chaque anticorps comprend plus d'une spécificité et chaque antigène est simple : c'est le modèle complexe simple.

Hirschfeld a aussi proposé le modèle complexe complexe qui selon lui, simplifierait les modèles immunogénétiques et l'écriture. Les modèles sont exposés dans les tableaux suivants :

TABLEAU 8

Chromosomes		Réactifs	
plexe simple	Simple complexe	Complexe simple	Simple complexe
Ag x1	Ag x a1 z g	Anti x123	Anti Ag x
Ag x2	Ag x a1 t g	Anti y123456	Anti Ag y
Ag x3	Ag x d t g	Anti x12 y1234	Anti Ag a1
Ag y1	Ag y a1 z c	Anti x3 y56	Anti Ag d
Ag y2	Ag y a1 z g	Anti x1 y12	Anti Ag z
Ag y3	Ag y a1 t c	Anti x23 y3456	Anti Ag t
Ag y4	Ag y a1 t g	Anti y135	Anti Ag c
Ag y5	Ag y d t c	Anti x123 y246	Anti Ag g
Ag y6	Ag y d t z		

Explications du système Ag selon les modèles complexe simple et simple complexe.

TABLEAU 9

Locus	Allèles	Réactifs
Ag A	Ag A^1 = Ag x z	Anti Ag A_{12} = anti g
	Ag A^2 = Ag y z	Anti Ag A_1 = anti x
	Ag A^3 = Ag y c	Anti Ag A_{23} = anti y
		Anti Ag A_3 = anti c
Ag B	Ag B^1 = Ag a1 z	Anti Ag B_{12} = anti a1
	Ag B^2 = Ag a1 t	Anti Ag B_1 = anti z
	Ag B^3 = Ag d t	Anti Ag B_{23} = anti t
		Anti Ag B_3 = anti d

Interprétation du système Ag par le modèle complexe complexe.

Le modèle simple complexe est défendu par Bütler (47) pour les 8 facteurs Ag principaux, il y aurait 4 loci dialéliques étroitement liés, l'ordre des loci est inconnu et a été écrit arbitrairement

Ag a1 Ag c Ag t Ag x

Ag d Ag g Ag z Ag y

Ce modèle donnerait théoriquement 16 chromosomes possibles, 136 génotypes différents et 81 phénotypes différents.

En fait, on ne connait que 9 chromosomes (69). Il y aurait restriction sur la variabilité : il semble par exemple, que Ag (z+ a1-) n'existe pas, de même, on ne connait que 19 phénotypes (47).

Le modèle complexe simple proposé par Hirschfeld (69) simplifierait les données existantes, il y aurait 9 chromosomes différents dans ce modèle.

Le choix entre ces modèles ne peut être fait avec des méthodes sérologiques conventionnelles.

En conclusion, le modèle simple complexe est actuellement celui qui est généralement retenu par les auteurs mais ce n'est qu'une hypothèse de travail.

D) Les Anticorps Anti Ag

1) Propriétés et fréquences des Anticorps

Nous raisonnerons toujours sur le modèle simple complexe.

Bütler (47) a trouvé 44 sérums anti Ag répartis ainsi :

- 29 monospécifiques Anti Ag (a1) 1
  Anti Ag (c) 3
  Anti Ag (x) 18
  Anti Ag (y) 4
  Anti Ag (z) 3

- 8 bispécifiques	Anti Ag (c ?)	1
	Anti Ag (a1 ?)	1
	Anti Ag (x ?)	1
	Anti Ag (c + y)	1
	Anti Ag (a1 + x)	2
	Anti Ag (x + g)	1
	Anti Ag (c + x)	1
- 6 trispécifiques	Anti Ag (c d y)	2
	Anti Ag (a1 g x)	2
	Anti Ag (a1 c x)	1
	Anti Ag (c x g)	1
- 1 tétraspécifiques	Anti Ag (c d t x)	

Ceci est compatible avec l'hypothèse actuelle de 4 loci étroitement liés (avec 16 complexes allèliques possibles).

Certaines spécificités anticorps, comme anti Ag (d), anti Ag (g) et anti Ag (t) n'ont été trouvé que dans des sérums polyspécifiques.

La distribution des fréquences des différents anticorps est la suivante (tableau 10) :

TABLEAU 10

Fréquence Ag	Anti Ag	% de la fréquence totale des Anticorps
75	a1	11,1
51,5	c	17,4
78	d	4,8
93	g	4,8
97	t	1,6
38	x	44,4
95,6	y	11,1
36	z	4,8
Total		100

Fréquence des Antigènes du système Ag comparée à la distribution de fréquence des Anticorps.

On voit d'après ce tableau qu'il semble, qu'à fréquence antigénique égale, x soit plus fortement antigénique que z, et y beaucoup plus fortement antigénique que t.

Place des anticorps anti Ag parmi les immunoglobulines :

Les anticorps anti Ag paraissent, au moins en majorité, appartenir aux globulines Ig G (2, 20). Mais on en a observé aussi dans les Ig A, au moins certaines spécificités comme anti HSH (20). Mais les résultats sur ce sujet sont encore trop peu nombreux, en raison notamment des faibles

quantités d'antisérums disponibles.

2) Formation des allo-anticorps contre les antigènes Ag

Malgré des essais répétés, on n'est jamais arrivé à obtenir des anticorps anti Ag chez l'animal. Les seuls anticorps observés sont d'origine humaine et sont consécutifs à une immunisation qui peut être produite par administration de sang total, de plasma, ou de facteurs contenant des LDL contenant des facteurs Ag non présents chez les sujets traités.

Les anticorps ne se produisent habituellement qu'après un grand nombre de transfusions (souvent supérieur à 40 (38)), administrées à intervalles réguliers pendant un temps prolongé (29). Ils ne s'observent qu'assez rarement, sauf chez les malades atteints de thalassémie (26, 93).

On peut donner un exemple des résultats obtenus par Berg et Bearn en 1970 (10) dans le dépistage des anticorps anti LDL par immunodiffusion chez les polytransfusés (tableau 11). Les précipitines sont dites "douteuses" quand les résultats obtenus ne sont pas hautement reproductible.

TABLEAU 11

ladies	Nbre de Sérums totaux	Nbre de Sérums avec précipitines "douteuses"	Nbre de Sérums avec précipitines certaines (fortes ou faibles)
ncers	114	4	0
fauts ulation	19	1	1
assémie	85	4	14
oubles ivers	5	0	1
otal	223	9	16

Résultats du dépistage des Anticorps Anti LDL par immuno-diffusion.

Plus récemment, la technique de l'hémagglutination passive a permis de mettre en évidence, en plus des anticorps précipitants, des anticorps hémagglutinants non précipitants : on peut prendre pour exemple cette étude comparative par les deux techniques de Boman et Berg 1971 (17) (tableau 12). La dernière colonne désigne les sérums dont l'activité hémagglutinante n'a pu être inhibée par addition de sérums normaux ou de LDL.

TABLEAU 12

Nbre de Sérums	Nbre de sérums hémagglutinants	Nbre de sérums précipitants	Nbre de sérums hémagglutinants non précipitants	Nbre de sérums à hémagglutination "incertaine"
109	1	0	1	5
15	2	1	1	0
38	10	4	6	0
12	0	1	0	2
174	13	6	8	7

Etudes comparative des résultats obtenus dans le dépistage des Anticorps Anti LDL par immunodiffusion et par hémagglutination passive en dehors de la thalassémie.

On voit que 8 antisérums sur 13 ont été détectés uniquement par la technique d'hémagglutination passive. On remarque également, que la fréquence des anticorps chez les cancéreux est très faible puisqu'on n'a décelé qu'un anticorps hémagglutinant et pas de précipitant parmi 109 cancéreux ceci est confirmé par d'autres publications (10, 20, 21).

Une mention spéciale doit être faite pour la thalassémie puisque celle-ci représente actuellement la prin-

cipale source d'isoanticorps anti LDL.

Voici quelques données (tableau 13) :

TABLEAU 13

ique	Auteurs	Echantillons	Nbre de Transfusions	% de sérums présentant Anticorps
	Blumberg (1964)	36	50	36
	Vierucci et Coll. 1968	47	20	13
io- sion	Bütler, Boman (1969)	47	20	10,6
	Berg Bearn (1970)	85		16,4
	Boman (1972)	39	100	20,5
gglu- tion	Boman (1972)	39	100	38,5

Résultats de dépistages d'Anticorps anti LDL chez les thalassémiques par différents auteurs.

On voit qu'avec la dernière technique, on arrive à une fréquence très importante d'isoanticorps d'après Boman parmi les sérums de thalassémiques.

La proportion de sérums précipitants est bien supérieure à celle trouvée par exemple par Bütler en 1969 : 10,6 %. Cette différence pourrait être due à des différences

dans le matériel étudié : d'une part, le nombre de transfusions des malades de Boman (1972) était souvent supérieur à 100, alors que les malades de Bütler avaient un nombre de transfusions supérieur à 20.

D'autre part, les deux groupes de malades étaient d'origine différente, Vierucci 1968 (94) a remarqué que les malades thalassémiques américains, développaient plus fréquemment des anticorps que les patients italiens : ceci pourrait être dû aux différences thérapeutiques, car les américains thalassémiques sont généralement d'origine italienne.

Donc actuellement, il semble qu'avec la technique d'hémagglutination passive, les sérums d'enfants thalassémiques sont un matériel très commode d'étude, pour les études immunogénétiques des groupes sériques des β lipoprotéines humaines.

La raison de la tendance prononcée de ces malades à faire des anticorps anti LDL (et aussi anti γ G) n'est pas connue. On pense qu'il y a une relation avec la spénomégalie : Vierucci et Coll. (93, 94) ont observé parfois une disparition des isoanticorps après splénectomie.

Selon Blumberg (26) il y a corrélation chez les thalassémiques entre le nombre de transfusions et l'apparition des anticorps précipitants, cela n'a pas été confirmé par Vierucci et Coll. (93).

Autres possibilités de formation des anticorps anti Ag :

Durwald et coll. (54) ont étudié 157 sérums de

multipares qui n'avaient jamais été transfusés. Ils ont trouvé 2 isoprécipitines anti LDL. Cette observation n'a pas été confirmé par Boman (20) dont la recherche d'isoanticorps dans les sérums de 101 multipares a été négative. On ne peut donc conclure actuellement sur ce point.

Formation chez les sujets sains non transfusés :

Blumberg (23) n'a pas trouvé de LDL précipitines dans les sérums de sujets normaux, récemment Boman (20, 21) a confirmé ce résultat. Bütler avait trouvé des sérums non précipitants qu'il avait appelé anti Ag (e) chez des sujets sains non polytransfusés, mais des études complémentaires ont montré qu'il ne s'agissait pas d'une véritable spécificité anti LDL (46).

Accidents d'incompatibilité :

On n'a pas rapporté jusqu'ici d'accidents d'incompatibilité grave (Vierucci et Coll. (94) rapportent quelques cas de légères réactions post-transfusionnelles qui pourraient être dues aux anticorps anti Ag. Bütler a montré l'incapacité des complexes Ag (x) Anti Ag (x) a fixé le complément (43), ce qui peut expliquer en partie l'absence de réactions du fait de l'impossibilité d'activation du complément, et donc de fixation du complexe sur une cellule, qui est le préliminaire indispensable à une action cytoxique (réaction de type anaphylactique) cependant, il existe bien sûr, d'autres mécanismes possibles d'accident d'incompatibilité).

Conclusion :

A part l'antigène anti Lp (a), les antigènes des LDL sont étudiées à partir des isoantisérums obtenus par des malades qui ont reçu de multiples transfusions de sang et particulièrement, à partir des thalassémiques.

La difficulté du recueil de quantités importantes des antisérums de ces malades est toujours un facteur limitant pour l'étude du polymorphisme des LDL, et jusqu'ici, il n'a pas été possible d'établir des grands stocks d'antisérums de référence dans plusieurs laboratoires.

L'introduction des techniques d'hémagglutination passive, en diminuant grandement les quantités de sérums nécessaires pour cette étude, permettront sûrement des progrès rapides, ainsi que la découverte de nouveaux groupes Ag moins fortement antigéniques que les précédents, par l'étude des sérums non précipitants.

III - CONCLUSION SUR L'ETUDE THEORIQUE DU POLYMORPHISME D'ORIGINE GENETIQUE DES β LIPOPROTEINES

Du point de vue immunologique, de nombreux points restent à éclaircir. Pourquoi les groupes Ag ne peuvent-ils être mis en évidence que par allo-immunisation antiplasmatique chez les polytransfusés (seul exemple connu à côté des groupes Gm), et jamais par hétéro-immunisation ?

Pourquoi l'allo-immunisation touche-t-elle préférentiellement les sujets atteints de thalassémie ? et au contraire, pourquoi est-elle spécialement rare chez les individus souffrant de cancers ?

Pourquoi cette isoimmunisation ne provoque-t-elle pas d'accident d'incomptabilité ?

Du point de vue génétique, l'intérêt de l'étude des groupes de β lipoprotéines est grand puisqu'il s'agit de nouveaux marqueurs génétiques dominants, c'est-à-dire utilisables pour :

- des études de génétique formelle
- des études de familles (transmission de caractères du système, linkage avec d'autres systèmes, études de filiation)
- des études de populations.
- et aussi les rapports éventuels avec des désordres métaboliques.

Enfin, il s'agit de marqueurs structuraux d'une classe de protéines encore mal connue, dont l'utilité se ré-

vèle généralement très grande à mesure que se développent les travaux concernant la structure de ces protéines.

Il reste bien entendu à faire la liaison entre les travaux des différents Auteurs de manière à connaître les relations génétiques entre les différents facteurs mis en évidence jusqu'ici, et à établir une nomenclature d'ensemble. Il faudrait également faire des expériences qui permettraient de décider entre les différents modèles immunogénétiques proposés.

TRAVAIL PERSONNEL

Ce travail a été réalisé au Centre National de Transfusion Sanguine de Paris, au Laboratoire des groupes sanguins et sériques dirigé par le Docteur J. Moullec.

Nous avons effectué un dépistage d'Anticorps Anti Ag sur des sérums de sujets ayant reçu de nombreuses transfusions.

A la suite de ce dépistage, nous avons sélectionné un sérum contenant plusieurs anticorps dont nous avons étudié la spécificité.

A l'aide de cet antisérum, grâce à des LDL appropriées, nous avons étudié la fréquence des facteurs Ag (a1) et Ag (g) de la région parisienne.

I - DEPISTAGE D'ANTICORPS ANTI Ag

Nous avons effectué ce dépistage sur des sérums de transfusés et des sérums de donneurs anti A et anti B.

A) Matériel et Méthodes :

Nous avons utilisé exclusivement la technique de l'hémagglutination passive décrite par Bütler et Coll. (37) parce que il a été montré que cette technique est aussi fidèle et beaucoup plus sensible que celle de double diffusion en gélose (39, 16).

1) Les globules rouges

Les globules rouges de groupe O recueillis récemment ont été lavés trois fois dans du sérum physiologique et une suspension à 50 % a été préparée.

2) Les LDL

a - Origine :

10 sérums de donneurs de sang parisiens (n° 1 à 10) avaient été testés au laboratoire du Docteur Bütler à Berne pour leurs facteurs Ag (tableau 14). On trouvera, en outre, à la suite de ce tableau les groupes Ag de 5 sérums de donneurs du panel de Berne.

TABLEAU 14

igine	n° de Sérum	Facteurs Ag a1	c	d	g	t	x	y	z	Réactions de LOG
	1	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	2	+	-	-	+	+	+	-	?	+
	3	-	+	+	-	+	-	+	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	-	+
aris	5	+	-	-	+	+	+	+	-	+
	6	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	7	+	-	+	+	+	-	+	+	+
	8	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	9	-	+	+	-	+	-	+	-	-
	10	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	17	-	+	+	+	+	-	+	-	
	38	+	-	-	+	-	-	+	+	
erne	46	+	-	-	+	+	-	+	+	
	74	+	+	-	+	+	-	+	+	
	209	+	-	+	+	+	+	-	-	

Tableau des phénotypes Ag des sérums de 10 donneurs de sang Parisiens (n° 1 à 10) et de 5 donneurs Suisses de Berne (n° 17 à 209).

Nous avons choisi pour le dépistage les LDL 1, 7, 8, 10 de manière à ce que chaque facteur antigénique soit représenté au moins deux fois.

b - Préparation des LDL purifiées :

Tous ces réactifs ont été préparés selon la méthode de Bütler. Nous avons préparé en outre des LDL selon la méthode de Burstein.

- Par ultra-centrifugation :

Ainsi que nous l'avons dit précédemment selon la technique de Bütler par centrifugation à 30 000 rpm pendant 16 h (sur spinco roter 30,2), aspiration par tube capillaire des LDL flottantes dialysé contre sérum physiologique 24 h.

- Par méthode chimique de Burstein (30) méthode 2 :

Principe : Ces méthodes reposent sur les propriétés de précipitation des lipoprotéines par des polyanions de faible poids moléculaire en présence de cations divalents, ou de polysaccharides de haut poids moléculaire sans cations (30) pouvant former des complexes insolubles avec les LDL.

Les conditions de précipitation des lipoprotéines par l'héparine dépendent du cation utilisé ; les α lipoprotéines précipitent plus difficilement que les β lipoprotéines, ce qui permet de les séparer.

Avec Mn^{++} on a directement une précipitation des LDL (31) mais avec Mg^{++} on a une précipitation élective des VLDL et il est nécessaire de diminuer la force ionique ou d'ajouter du sucrose (32) si l'on veut faire précipiter les LDL. En utilisant d'autres polyanions que l'héparine, on peut précipiter non seulement LDL et VLDL, mais aussi HDL si de plus fortes concentrations sont utilisées.

Il semblerait que la difficulté plus ou moins grande de précipitation dépendrait surtout de l'importance plus ou moins grande du rapport protéines/lipides des différentes fractions plutôt que de la fraction lipidique elle-même (30).

Burstein a ainsi décrit plusieurs méthodes pour séparer les différentes classes de lipoprotéines (31, 32, 33, 34, 35). Nous avons choisi une méthode permettant de séparer les LDL et VLDL des autres fractions lipoprotéiques.

Méthode de préparation (30 méthodes deux) : Le sérum est préalablement débarassé des chilomicrons par centrifugation à 30 000 t/min pendant 30 mn.

A 100 ml de sérum on ajoute 4 ml d'héparine à 5 % (concentration finale 2°/$_{oo}$) et 5 ml d'une solution molaire de Mn Cl_2 (concentration finale 0,05 M) un trouble apparaît aussitôt ; après centrifugation 10 mn à 6000 g ou plus si le sérum est lactescent, on sépare un précipité jaune d'un surnageant clair qui est éliminé.

Le précipité est redissout 15 mn à 37° par 1 ml de bicarbonate à 10 % ; on centrifuge 10 mn et on élimine le précipité blanc de Mn ; on ajoute 100 ml de tris HCl 0,02 M à PH 7,7 au surnageant. On fait précipiter en ajoutant 2,5 ml de Mg Cl_2 M (0,05 M), on centrifuge 10 mn à 6 000 g et on jette le surnageant. On redissout dans 2 ml de Na Cl à 5 % on ajoute 100 ml de tris HCl et 2,5 ml de Mg Cl_2 2 M et on obtient un précipité on centrifuge 10 mn à 6 000 g, on jette le surnageant, on dissout le précipité dans du bicarbonate à 10 %.

Au début une dialyse de 24 h contre Na Cl était pratiquée mais on s'est aperçu que ceci était inutile du point de vue de la pureté et des propriétés antigéniques et de plus, diluait les LDL obtenues par cette méthode.

Il est à remarquer que la technique de Burstein permet de séparer les LDL des VLDL en jouant sur les concentrations d'héparine. Avec une concentration finale de 0,1 %, on ne précipite que VLDL et chylomicrons.

Critique de la méthode : Cette méthode de préparation de LDL semble être élective et complète (il n'y a pas de précipitation dans un sérum dépourvu de LDL et l'analyse chimique du précipité montre bien la composition attendue pour les LDL (30)). Burstein l'a montré, en effet, en électrophorèse sur agarose et en immunoélectrophorèse.

D'autre part, et ceci est très important, il semble que les propriétés antigéniques de la molécule ne soient pas altérées par cette méthode de préparation ; en effet, si on fait réagir la préparation ainsi obtenue contre du sérum de cheval anti-sérum humain en immunoélectrophorèse, on obtient uniquement l'arc de précipitation des β lipoprotéines (30). Enfin un dernier point qui mérite d'être souligné, est que cette méthode permet d'obtenir des solutions concentrées de LDL par rapport aux autres méthodes de préparation : rendement de 0,2 à 0,4 g pour 100 ml de sérum à peu près ; il semble que la conservation soit plus longue avec les solutions concentrées.

Une critique est que l'on sépare en plus des LDL,

les VLDL, mais il semble que cela ne présente pas d'inconvénients pour l'utilisation ultérieure des LDL.

Un inconvénient possible de la méthode était la possibilité de dénaturation partielle des molécules de LDL pouvant conduire à une altération des propriétés antigéniques c'est pourquoi nous avons comparé les LDL d'un même sérum préparées d'une part, par ultracentrifugation et d'autre part, par la méthode chimique : dans le laboratoire du Docteur Bütler nous avons trouvé des titres équivalents avec un anti-sérum de référence quelle que soit la méthode de préparation utilisée. Cependant, par la suite, nous avons préparé les LDL par ultracentrifugation pour employer une technique homogène par rapport à celle de Bütler.

Dosage des LDL dans les préparations purifiées :

- Par spectrophotomètre de Jobin
- Par dosage spectrophotométrique du cholestérol total.

Technique colorimétrique de Pearson et Coll. (1953) (84 bis)

Réactifs : 1) solution standard de cholestérol 100 mg dans 50 ml d'acide acétique glacial

2) 12 g d'acide para toluene sulfonique dans 100 ml d'acide acétique glacial

3) anhydride acétique RP

4) acide acétique glacial merck pour analyse

5) acide sulfurique merck

Technique : Dans un tube d'appareil Coleman, mettre successivement et sans agiter :

- 0,1 ml de sérum,
- 0,1 ml d'acide acétique,
- 0,5 ml d'acide para toluene sulfonique,
- 1,5 ml d'anhydride acétique.

Quand le mélange est refroidi, ajouter précisément 0,2 ml d'acide sulfurique et agiter vigoureusement.

Dans le tube standard, on fait le même mélange mais on remplace 0,1 ml de sérum par 0,1 ml de la solution standard et 0,1 ml d'acide acétique par 0,1 ml d'eau.

Dans le tube blanc, on remplace les 0,1 ml de sérum du premier tube par 0,1 ml d'eau.

On attend 20 mn et on lit au spectrophotomètre de Coleman à 550 mμ.

La dose de cholestérol se calcule par le rapport

$$\frac{\text{lecture échantillon}}{\text{lecture standard}} \times 2 = \text{grammes de cholestérol/litre}$$

La dose de LDL se calcule par le rapport

$$\frac{\text{dose de cholestérol} \times 120}{36} = \text{grammes de cholestérol/litre}$$

3) Les sérums examinés

75 sérums de polytransfusés dont le nombre de transfusions était supérieur à 20, 10 avaient reçu plus de 40 transfusions. Trois provenaient de thalassémiques, le diagnostic exact des autres malades polytransfusés n'était

généralement pas connu, il s'agissait généralement de désordres hématologiques.

22 sérums anti A et 7 sérums anti B provenaient de donneurs de sérums tests immunisés contre les substances de groupe A et B.

4) Sérum anti β lipoprotéines

Préparé par injection à un lapin d'un pool de LDL purifiées de donneurs de sang humain, puis prélèvement du sérum du lapin immunisé et absorption par des globules rouges humains pendant 24 heures.

5) Technique d'hémagglutination passive

Cette technique est celle de Bütler décrite plus haut (Méthodes d'étude II. B. a)

a - Principe :

On fixe sur des globules rouges de la LDL purifiée choisie parce qu'elle porte tel ou tel facteur Ag. Les Antisérums contenant des anticorps contre ce facteur agglutinent ces globules rouges.

b - Matériel :

Le matériel qui a été employé pour le dépistage des anticorps anti Ag et plus tard pour la détection des groupes Ag est le suivant (L'usage nous en a été montré dans le laboratoire du docteur Bütler) :

- Microplaques à fond conique (lucite v plate 220 - 7)
- Microdilutter 25 /Ul (MTG n° 220 - 33)
- Pipettes 25 /Ul (MTG n° 221 - 5)

Les microdilutters servaient à faire les dilutions de sérums en série sur les microplaques (des cartons portant des cibles de taille standard permettent de s'assurer que le microdilutter transporte bien 25 /Ul de liquide).

Les micropipettes servaient à mettre des quantités standard d'hématies couplées dans chaque godet des microplaques.

Les intérêts de cette méthode sont :

- l'économie de matériel et en particulier d'antisérum (25 /Ul dilué ou non dans chaque godet)
- la diminution du nombre des causes d'erreurs et la rapidité d'emploi grâce à la possibilité de faire les opérations en série.
- la meilleure reproductibilité puisque les mêmes quantités exactement de matériel sont utilisées pour chaque godet.

Les inconvénients sont :

- le nettoyage obligatoire des microplaques après manipulation doit être très soigneux, sinon on risque d'avoir de fausses

réactions d'hémagglutination à la manipulation suivante.

- la lecture nous a paru également être plus délicate qu'avec des quantités plus importantes d'hématies et de sérums.

c - Mode opératoire :

Chaque sérum de polytransfusé est testé à 3 dilutions différentes 1/4, 1/8 et 1/64 contre 4 LDL différentes de groupes Ag connus, couplés aux globules rouges. Ces 4 LDL étaient choisis de manière à ce que chaque facteur antigénique soit représenté au moins deux fois.

TABLEAU 15

N° LDL	a1	c	d	g	t	x	y	z
1	+	-	-	+	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	-	+	+
8	-	+	+	+	+	-	+	-
10	+	+	+	+	+	+	+	-

Facteurs de groupe Ag dans 4 sérums sélectionnés pour le dépistage des anticorps anti LDL.

Les témoins étaient les suivants :

Témoin + : Globules rouges sensibilisées + immun antisérum de référence

Témoin - : 1. LDL couplées + sérum de lapin normal absorbé

2. LDL couplées + sérum humain normal (pour chaque LDL)
3. Globules rouges normaux + immun antisérum
4. Globules rouges normaux + sérum de polytransfusés
5. Globules rouges normaux + diluant

Une expérience préalable de titrage de l'immun antisérum de référence, a montré que les titres obtenus avec les quatre préparations de LDL étaient satisfaisants (tous supérieurs à 1/1000 ceci en utilisant 3 mg de chaque LDL pour les sensibilisations).

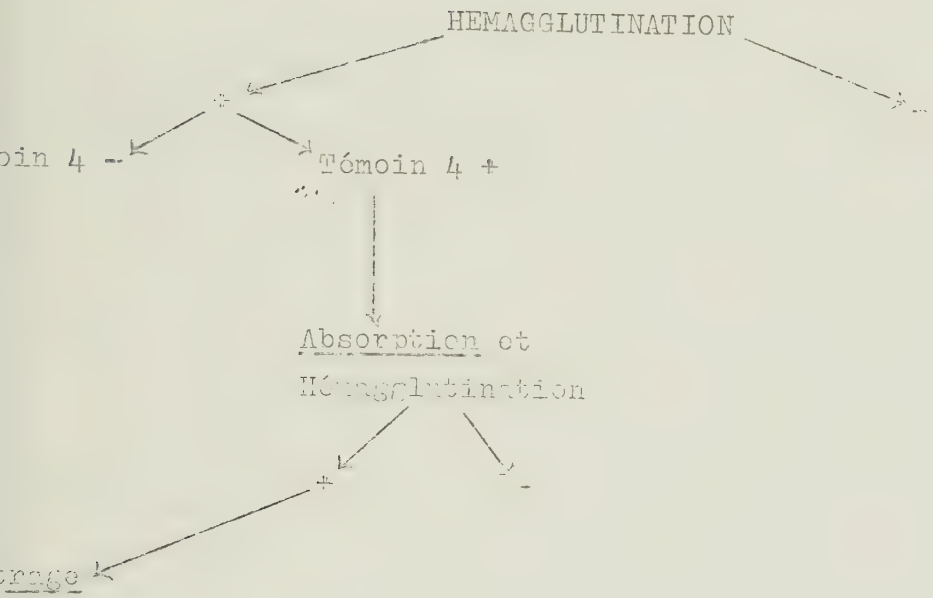
Interprétation des réactions des témoins :

- Si le témoin positif est négatif, c'est que la sensibilisation a échoué, il faut recommencer.
- Si le témoin 5 agglutine, c'est probablement que le tampon est infecté.
- Si le témoin 3 agglutine, c'est l'immun antisérum n'est pas correctement absorbé.
- Si le témoin 1 agglutine, ou si le témoin 2 agglutine, c'est que les globules couplés sont spontanément agglutinés ou que les sérums normaux contiennent un facteur agglutinant.
- Enfin et c'est le plus fréquent, si le témoin 4 agglutinine, on peut penser qu'il y a un anticorps anti-érythrocytes dans le sérum : on peut essayer une absorption du sérum par les globules humains, puis recommencer une hémagglutination passive, on peut voir, les témoins étant négatifs, s'il y

a des anticorps spécifiques anti LDL.

Le plan de travail du dépistage des anticorps est donc le suivant :

TABLEAU 16



ition

ermination des spécificités Anticorps)

Plan de travail du dépistage des Anticorps anti LDL

B) Résultats du dépistage

Le nombre des anticorps détectés est faible. Cela ne doit pas surprendre et s'accorde avec les résultats obtenus par divers auteurs. Il n'y avait parmi les 75 sérums sujets examinés que 3 échantillons provenant de thalassémiques

D'autre part, le nombre de transfusions n'était pas toujours précisé. Il se trouve que le seul sérum utilisable provenait de l'un des trois thalassémiques.

Les résultats du dépistage sont résumés dans le tableau 17.

TABLEAU 17

Nbre de Sérums	Subdivisions	Hémagglutination	Spécificité	Absorption	Titrage	Inhibition
72	55	-				
	17 : 12		non	-		
	17 : 1	+	non	+	+ 1/8	non
	17 : 3		oui		+ 1/4	non
3	1		oui		+ 1/128	oui
22	21	-				
	1	+	oui		+ 1/8	?
7	7	-				

Résultats du dépistage des anticorps anti LDL

Ce tableau montre que parmi les 75 sérums de malades, nous avons obtenu 5 sérums dont le pouvoir agglutinant pour les globules rouges sensibilisés persistait après absorption par des globules rouges normaux.

Parmi ces sérums, 4 n'ont pas pu être inhibés par les sérums normaux. Un seul a permis une inhibition : c'est celui de l'un des thalassémiques dont l'étude a été poursuivie.

Parmi les sérums de donneurs de sérums tests, un anti A possédait un anticorps qui pouvait être un anti Ag (e) son étude n'a pas encore été réalisée.

En résumé, dans un dépistage fait sur les sérums de 75 polytransfusés des hôpitaux parisiens, dont 3 étaient thalassémiques, on en a trouvé 4 avec anticorps spécifiques Anti LDL titrables, et un seul de ces antisérums a permis de réaliser la technique d'inhibition d'hémagglutination : c'était celui d'un thalassémique majeur.

A noter aussi, la présence d'une spécificité anti Ag titrable dans le sérum d'un sujet anti A fort.

II - ETUDE D'UN SERUM ANTI Ag

La spécificité du sérum LOG provenant d'un enfant âgé de 15 ans, atteint de Thalassémie majeure, et ayant reçu plus de 200 transfusions a été étudiée.

Ce sérum agglutinait les quatre échantillons de globules rouges revêtus de LDL utilisés pour le dépistage.

A) Réactions du sérum LOG sur le Panel :

D'après le tableau 12, on voit que seuls LDL 3 et 9 ne réagissent pas avec le sérum LOG, ce qui conduit logiquement à éliminer la possibilité d'anticorps Anti Ag (c), Anti Ag (d), Anti Ag (t), Anti Ag (y) dans le sérum LOG, puisque les sérums 3 et 9 étaient Ag (c+ d+ t+ y+). Cependant de nombreuses combinaisons d'anticorps restaient possibles ceci nous a conduit à faire des épreuves d'absorption.

B) Epreuves d'inhibition d'hémagglutination :

1) Technique

Cette méthode a déjà été décrite plus haut, Bütler (39).

a - Principe :

On mélange les sérums du Panel (connus) avec du sérum LOG et on fait réagir avec des globules rouges revêtus de LDL préparée à partir des sérums du Panel.

Si on observe une inhibition, cela permet d'affirmer que le sérum LOG ne contient aucun des anticorps correspondant aux facteurs Ag contenus dans la LDL et non dans le sérum inhibiteur.

Si on observe une hémagglutination, cela permet de dire que la réaction peut être due à la présence dans l'antisérum d'au moins un des anticorps correspondant aux facteurs existants dans la LDL et non dans le sérum inhibiteur.

b - Mode opératoire :

Chaque test d'inhibition d'hémagglutination a été réalisé au moins deux fois, indépendamment.

L'antisérum a été utilisé à la dilution 1/10, les témoins réalisés étaient les suivants, et les sérums inhibiteurs ont été employés à deux dilutions 1/4 et 1/8.

- les témoins 1 à 5 déjà énumérés pour le dépistage des anticorps
- un témoin négatif (6) : LDL couplée + sérum inhibiteur dilué (pour chaque sérum inhibiteur).

La disposition des réactions sur les plaques était la suivante :

TABLEAU 18

		1	2	3..... Sérums inhibiteurs
LDL 1	4	.	.	. Tpos
	8	.	.	.
	K	.	.	.
LDL 2	4			Tpos
	8			
	K			

K = témoin 6

Tpos = LDL couplée + Antisérum

Mode de disposition des réactions d'inhibition d'hémagglutination sur les plaques

La lecture n'a lieu que si le témoin positif est hémagglutiné. Elle a toujours lieu comparativement au témoin négatif 6, celui-ci doit être franchement négatif.

Les deux dilutions pour le sérum inhibiteur doivent permettre d'interpréter des réactions douteuses de titre intermédiaire, dans le sens inhibition ou hémagglutination s'il y avait inhibition réelle, mais peu lisible, l'hémagglutination est toujours plus nette pour la dilution 8. On a donc fait les expériences selon ce protocole.

2) Résultats

L'absorption du sérum LOG, par des sérums de phénotypes choisis, et les tests d'agglutination, par les échantillons ainsi absorbés, de globules revétus d'une série de LDL, a permis de détecter trois anticorps : anti Ag (a1), anti Ag (x) et anti Ag (g).

La spécificité d'anti Ag (a1) et d'anti Ag (g) a été reconnue dans notre laboratoire. Celle d'anti Ag (x), dans le laboratoire du Docteur Bütler à Berne qui a confirmé en outre, sur un plus large panel, la spécificité des deux autres anticorps.

Les réactions du sérum LOG sur le panel de LDL dont nous disposions, sont indiquées dans le tableau 19, qui montre aussi les réactions obtenues par des échantillons de cet antisérum absorbé par des sérums de phénotypes connus.

TABLEAU 19

N° de LDL	Phénotypes Ag des LDL a1	c	d	ε	t	x	y	z	a LOG	b Réactions LOG /1	LOG /2	LOG /3	LOG /8	LOG /38	LOG /46	LOG /74	LC /
1	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
2	+	-	-	+	+	+	-	?	+	-	-	+	+	+	+	+	
3	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	
5	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	
6	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	
7	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	
8	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	
9	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	
17	-	+	+	+	+	-	+	-									
38	+	-	-	+	-	-	+	+									
46	+	-	-	+	+	-	+	+									
74	+	+	-	+	+	-	+	+									
209	+	-	+	+	+	+	-	-									

Code : + hémagglutination

- inhibition d'hémagglutination

Réactions de sérum "LOG" sur le "panel" de LDL (hémagglutination passive)

Réactions d'inhibition du sérum "LOG" par des sérums de phénotypes connus (inhibition d'hémagglutination passive).

Technique d'interprétation des réactions b :

- : cela permet d'affirmer que l'antisérum testé ne contient aucun des anticorps correspondant aux facteurs qui se trouvent dans la LDL et non dans le sérum inhibiteur.

+ : cela permet de dire que la réaction peut être due à la présence dans l'antisérum d'au moins un des anticorps correspondant aux facteurs existants dans la LDL et non dans le sérum inhibiteur.

Ici les difficultés rencontrées étaient les suivantes :

- Manque d'antisérum de référence
- Manque de LDL (a1-, x+) qui aurait permis de savoir directement si l'antisérum était anti a1 et anti x, ou anti a1, ou anti x.
- Et surtout fausses réactions positives dues à des sérums hors d'usage.
- Parfois, les témoins négatifs n'étaient pas clairement négatifs.
- Enfin, il est arrivé que le témoin positif soit négatif.

On a donc trouvé un sérum de thalassémique polytransfusé qui possède des isoanticorps anti LDL. Une triple spécificité anti Ag (a1) anti Ag (g), et anti Ag (x) a été révélée par inhibition d'hémagglutination.

III - FREQUENCE DES FACTEURS Ag (a1) et Ag (g)

A) Matériel et Méthodes

1) Sérums examinés

Il s'agit de 217 sérums provenant de donneurs dont beaucoup déjà groupés pour les systèmes ABO, Rh, Kell, MN, Ss, P, Lewis, Duffy et Kidd. Cet échantillon avait subi une sélection dans le système Kell : il ne comprenait que des sujets Kell négatifs.

2) Technique d'inhibition de l'hémagglutination

Ces sérums ont été testés par inhibition de l'agglutination par le sérum LOG de globules rouges revêtus de l'un ou l'autre des deux LDL :

LDL 7..... Ag (a1+ g+ x-)

LDL 8..... Ag (a1 - g+ x-)

B) Résultats

Pour détecter directement le facteur Ag (g), nous disposions de la LDL 8, qui était Ag (a1- g+ x-) et ne réagissait qu'avec l'anti Ag (g) contenu dans notre Antisérum. Toute inhibition de la réaction ne pouvait être due qu'à la présence de Ag (g) dans le sérum test ; et tout facteur Ag (g)

présent devait provoquer une inhibition.

Mais nous ne disposion d'aucune LDL Ag (a1+ g- x-) qui aurait permis de détecter ce même Ag (a1).

Nous pouvions néanmoins obtenir une estimation satisfaisante de la fréquence de Ag (a1) d'après les expériences d'inhibition effectuées : les résultats sont indiqués au tableau 20.

TABLEAU 20

Groupage Ag sérums	Globules couplés avec LDL		Fréquence
	a1+ g+	a1- g+	
a1+ g+	+	+	77,5 %
a1- g+	-	+	14,6 %
a1+ g- a1- g-	-	-	7,9 %

Code : + inhibition

- hémagglutination

Résultats du groupage Ag (a1) et Ag (g) des sérums de 217 donneurs de sang parisiens.

Ce tableau montre que l'on ne pouvait pas, dans les conditions de l'expérience, distinguer les sérums Ag (a1+ g-) des sérums Ag (a1- g-). Mais les statistiques faites dans la population suisse (47) montrent que le facteur Ag (a1) est beaucoup plus fréquemment associé à Ag (g) que présent sans lui. De sorte que, avec une assez bonne approxi-

mation, on peut considérer que les seuls sérums Ag (a1+) sont ceux qui contiennent aussi Ag (g).

Les fréquences, pour ces deux facteurs, sont très voisines de celles trouvées à Berne sur 238 sujets (47), comme le montre le tableau 21.

TABLEAU 21

Facteur	Paris %	Berne %
Ag (a1+)	77,5 ± 7	75
Ag (g+)	92,1 ± 3,6	92,8

Fréquences comparées à Paris (217 sérums) et Berne (238 sérums) de Ag (a1+) et Ag (g+).

IV - TEST D'INDEPENDANCE ENTRE LES FACTEURS Ag ET LES AUTRES GROUPES SANGUINS CONNUS CHEZ LES DONNEURS PARISIENS.

On a choisi de tester avec le facteur Ag (a) car on sait que les groupes Ag sont étroitement linkés entre eux et d'autre part il est plus intéressant de choisir Ag (a1) que Ag (g) car sa fréquence est moins proche de un et cela donnera des effectifs plus équilibrés pour les tests.

Les résultats sont consignés sur les tableaux 22 à 30.

TABLEAU 22

	D+	D-	Total
)	32 32,5	6 5,5	38
)	112 111,5	18 18,5	130
	144	24	168

χ^2_1 ddl non significatif

Rhésus

TABLEAU 23

	MM	MN	NN	Total
Ag (a+)	36 38	70 67	20 21	126
Ag (a-)	13 11	17 20	7 6	37
	49	87	27	163

χ^2_2 ddl non significatif

MN

TABLEAU 24

	ss	Ss + SS	Total
+)	40 39	31 32	71
-)	8 9	9 8	17
	48	40	88

χ^2_1 ddl non significatif

Ss

TABLEAU 25

	O	A	B+ AB	Total
Ag (a+)	59 58	52 52	19 20	130
Ag (a-)	16 17	15 15	7 6	38
	75	67	26	168

χ^2_1 ddl non significatif

ABO

TABLEAU 26

	P1	P2	Total
a+)	100 100,5	22 21,5	122
a-)	31 30,5	6 6,5	37
	131	28	159

χ^2_1 ddl non significatif

P1 P2

TABLEAU 27

	JK(a+)	JK (a-)	Total
Ag (a+)	34 34	14 14	48
Ag (a-)	9 9	4 4	13
	43	18	61

χ^2_1 ddl non significatif

Jka

TABLEAU 28

	Lea+	Lea-	
a+)	29 27	96 98	125
a-)	6 8	29 27	35
	35	125	160

χ^2_1 ddl non significatif

Le a

TABLEAU 29

	Leb+	Leb-	
Ag (a+)	62 64,5	61 58,5	123
Ag (a-)	22 19,5	14 16,5	36
	84	75	159

χ^2_1 ddl non significatif

Le b

TABLEAU 30

	Fy a+	Fy a -	
(a+)	44 45,5	26 24,5	70
(a-)	12 10,5	4 5,5	16
	56	30	86

χ^2_1 ddl non significatif

Fy a

Code : Chiffres théoriques (répartition au hasard) en bas et à droite de chaque case.

Test d'indépendance entre les répartitions de Ag (a) et celles de 9 autres systèmes dans l'échantillon des sérums de donneurs parisiens.

Ces tests ne nous permettent pas de conclure à une association entre les groupes Ag d'une part, et d'autre part, les groupes Rh, MN, Ss, ABO, P, Le a, Le b, Fy a, Jka.

CONCLUSION

Ce travail a été réalisé dans le cadre du Laboratoire des groupes sériques du Centre National de Transfusion sanguine de Paris.

Dans une première étape, nous avons comparé les différentes techniques permettant l'étude du polymorphisme d'origine génétique des LDL (low density lipoproteins). Nous avons adopté la technique d'hémagglutination passive décrite par Bütler et Coll. (37) car elle s'est montrée aussi fidèle et beaucoup plus sensible que la double diffusion en gélose.

Pour la préparation des LDL purifiées, nous avons comparé la méthode de préparation par ultra centrifugation (39) et la méthode chimique de Burstein (30). Nous avons constaté que les deux méthodes donnaient d'aussi bons résultats en ce qui concerne l'hémagglutination passive, mais que la méthode de préparation chimique avait l'avantage de donner des solutions très concentrées de LDL, ce qui peut être intéressant pour la conservation de longue durée.

Nous avons procédé au groupage Ag de 10 sérums de donneurs parisiens dans le laboratoire du Docteur Bütler à Berne (qui disposait des Antisérums de référence nécessaires).

Grâce à ce "panel", nous avons effectué un dépistage d'anticorps Ag, d'une part, sur 75 sérums de polytransfusés ayant reçu plus de 20 transfusions (3 sérums provenaient de thalassémiques), d'autre part sur 22 sérums anti A et 7 sérums anti B provenant de donneurs de sérums-tests

immunisés contre les substances de groupe A et B.

Parmi les 75 sérums de malades, nous avons obtenu 5 sérums dont le pouvoir agglutinant pour les globules rouges sensibilisés persistait après absorption par des globules rouges normaux.

Parmi ces sérums, 4 n'ont pu être inhibés par les sérums normaux. Un seul a permis une inhibition, c'était le sérum "LOG" d'un thalassémique majeur ayant reçu plus de 200 transfusions et âgé de 15 ans. Le titre trouvé pour ce sérum était de 1/128.

Parmi les sérums de donneur de sérum-tests, un anti A possédait un anticorps qui pouvait être un anti Ag (e) son étude est en cours.

La spécificité du Sérum LOG a été étudiée : les réactions du sérum LOG sur le Panel, compte tenu des facteurs de groupe Ag connus de ce Panel, ont permis de montrer que LOG ne contenait pas d'Anti Ag (c), Anti Ag (d), Anti Ag (t) ni Anti Ag (y).

Les épreuves d'inhibition d'hémagglutination en prenant toujours les échantillons du Panel à la fois comme sérum inhibiteur et comme LDL ont permis de montrer que le sérum LOG était anti Ag (a1), anti Ag (g), anti Ag (x).

Nous avons alors déterminé la fréquence des facteurs Ag (a1) et Ag (g) sur un échantillon de 217 sérums de donneurs de sang parisiens pris au hasard, en étudiant l'inhibition d'hémagglutination par le sérum LOG de globules rouges revétus de l'une ou l'autre des LDL Ag (a1+ g+ x-) ou

LDL Ag (a1- g+ x-) (nous ne disposons pas de LDL Ag (a1+ g- x-)).

Par cette méthode nous avons déterminé directement la fréquence de Ag (g+) ; nous avons estimé Ag (a1+) par déduction en négligeant les Ag (a1+ g-) qui sont rares dans la population suisse.

Nous avons trouvé sur l'échantillon de 217 donneurs de sang parisiens :

Fréquence de Ag (g+) = 0,921 $\pm$ 0,036

Ag (a1+) = 0,775 $\pm$ 0,07

Ceci est en concordance avec les résultats trouvés par Bütler sur 238 donneurs de Berne.

Une étude statistique sur notre échantillon ne nous a pas permis de trouver d'association entre les groupes Ag (a1) d'une part et les groupes ABO, Dd, MN, Ss, P, Le (a), Le (b), Fy (a), JK (a) d'autre part.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ALLISON A. C. et BLUMBERG B. S.
An isoprecipitin reaction distinguishing human serum protein types.
Lancet, 1961, i : 634

2 - ALLISON A. C. et BLUMBERG B. S.
Serum lipoprotein allotypes in man
Progr. Med. Genet. 1965, 4 : 176

3 - BEAUMONT J. L.
L'hyperlipidemie par auto anticorps anti β lipoproteines : une nouvelle entité pathogène
Compte Rendu Acad. Sc. Paris 261 : 4563 - 1965

4 - BERG K.
A new serum type system in man, the Lp system.
Acta path. microbiol. scand. 1963, 59 : 369

5 - BERG K.
Norske Laegeforen 1964, 84, 96

6 - BERG K.
Immunochemical studies of the Lp (a) factor
Acta path. microbio. scand. 1964, 62 : 600

7 - BERG K.
Comparative studies on the Lp and Ag serum type systems
Acta path. microbio. scand. 1964, 62 : 276

8 - BERG K.
A new serum type system in man.
The Ld system. Vox Sang, 1965, 10 : 513.

9 - BERG K. et BEARN A. G.
Genetic polymorphism of human serum βlipoprotein
J. Clin. Invest. 1967, 46 : 1036

10 - BERG K. et BEARN A. G.
Antibodies to inherited βlipoprotein antigens in the serum of multiply transfused patients.
Clin. Genet. 1970, 1 : 104.

11 - BERG K. et BEARN A. G.
1970 3 RD int. cong. human gen. Chicago P. 7

12 - BERG K.
Genetic polymorphism of lipoproteins.
Prot. Biol. Fluids 1971, p. 169.

13 - BERG K. et ERIKSON A. W.
Genetic marker systems in Artic populations.
I. Lp and Ag data on the Groenland Eskimos.
Hum. Hered, 1971, 21 : 129.

14 - BOMAN H., BERG K. et STAVEM P.
Studies on inherited antigenic variation of human serum βlipoprotéin by passive hemagglutination.
III Screening for antibodies in serum from multiply transfused patients.
Clin. Genet. 1971, 2 : 115.

15 - BOMAN H.
Studies on inherited antigenic variation of human serum βlipoprotein by passive hemagglutination
I Methodological studies
Int. J. Prot. Res. 1970, 2 : 209.

16 - BOMAN H. et SOLAAS M. H.
Studies on inherited antigenic variation of human serum βlipoprotein by passive hemagglutination
II Comparaison of the passive hemagglutination inhibition and immunodiffusion methods.
Int. J. Prot. Res. 1971, 3 : 175.

17 - BOMAN H., BERG K. et STAVEM P.
Studies on inherited antigenic variation of human serum βlipoprotein by passive hemagglutination
III Screening for antibodies in sera from multiply transfused patients.
Clin. Genet. 1971, 2 : 115.

18 - BOMAN H.
Studies on inherited antigenic variation of human serum βlipoprotein by passive hemagglutination
V Studies on a non-precipitating antiserum.
Hum. Hered. 1971, 21 : 614.

19 - BOMAN H.
Studies on inherited antigenic variation of human serum βlipoprotein by passive hemagglutination.
IV Studies on the antibodies in two non-precipitating sera
Int. J. Pept. Prot. Res. 1972, ± : 141.

20 - BOMAN H. et KLAUSEN H.
Studies on inherited antigenic variation of human serum βlipoprotein by passive hemagglutination
VI Screening for antibodies in sera from multiparous women and from normal individuals.
Clin. Genet. 1972, 3 : 180.

21 - BOMAN H., LANZKOWSKY P. et BERG K.
Studies on inherited antigenic variation of human serum β lipoprotein by passive hemagglutination
VII Isoantibodies in sera from children with thalassémia
Clin. Genet. 1972, 3 : 201.

22 - BLUMBERG B. S., DRAY S. et ROBINSON J. C. .
Antigen polymorphism of a low-density beta-lipoprotein. Allotypy in human serum.
Nature 1962, 194 : 656.

23 - BLUMBERG B. S., BERNANKE D. et ALLISON A. C.
A human lipoprotein polymorphism.
J. Clin. Invest. 1962, 41 : 1936.

24 - BLUMBERG B. S.
Iso-antibodies against inherited serum low density β lipoproteins : the Ag system.
Ann. N. Y. Acad. Sc. 1963, 103 : 1052.

25 - BLUMBERG B. S. et RIDDELL N. M.
Inherited antigenic differences in human serum β lipoproteins. A second antiserum.
J. Clin. Invest. 1963, 42 : 867.

26 - BLUMBERG B. S., ALTER H. J., RIDDELL N. M. et ERLANDSON M.
Multiple antigenic specificities of serum lipoproteins detected with sera of transfused patients.
Vox Sang 1964, 9 : 128.

27 - BLUMBERG B. S., MALARTIN L., GUINTO R. A. et WERNER B.
Family studies of a human serum isoantigen system (Australia antigen).
Amer. J. hum. Genet. 1966, 18 : 594.

28 - BRADROOK I. D., GRANT A. et ADINOLFI M.
Ag (x) and Ag (y) antigens in studies of paternity cases in the United Kingdom.
Hum. Herd. 1971, 21 : 493.

29 - BUNDSCHUH G., GESERICK G., MAREK Z. et FUNFHAUSEN G.
Anti Ag nach 16 transfusionen. Frequenz von Ag in der Berliner Bevölkerung.
Deutch Gesundh. Wes. 1963, 18 : 819.

30 - BURSTEIN M., SCHOLNIK H. R. et MORFIN R.
Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions.
J. of lipid research 11, 1970.

31 - BURSTEIN M. et SAMAILLE J.
Dosage de cholesterol lié aux α et β lipoproteines.
Clin. chemica acta 5, 609, 1960.

32 - BURSTEIN M. et SAMAILLE J.
Sur la précipitation sélective des β lipoprotéines du sérum par l'héparine et les héparinoïdes de synthèse en présence de Cl_2 Ca.
J. de Physio. 49, 83, 1957.

33 - BURSTEIN M.

Précipitation sélective des lipoprotéines sériques de faible densité par l'héparine, en présence du chlorure de magnesium et de saccharose

C. R. Acad. Sc. 255, 605, 1962.

34 - BURSTEIN M. et MORFIN R.

Précipitation des lipoprotéines sériques α et β par des polysaccharides sulfatés en présence du chlorure de Manganèse.

Nouv. Rev. Fse Hemat. 1969, 9 : 231.

35 - BURSTEIN M. et MORFIN R.

Life Sc. 8 : 345, 1969.

36 - BUTLER R.

New observations on anti Ag sera

Vox Sang 1965, 10 : 736.

37 - BUTLER R. et BRUNNER E.

A new sensitive method for studying the polymorphism of the human LDL.

Vox Sang 11, 738, 740, 1966.

38 - BUTLER R.

Polymorphism of the human low density lipoproteins

Vox Sang 1967, 12 : 217.

39 - BUTLER R., BRUNNER E., VIERUCCI A. et MORGANTI G.

Comparative studies on anti Ag sera in immunodiffusion and in passive hemagglutination methods.

Vox Sang 1967, 13 : 327.

40 - BUTLER R., BRUNNER E., POLITIS E. et SCALOUMBACAS N.
A new precipitating anti Ag antibody.
Vox Sang 1967, 13 : 508.

41 - BUTLER R. et BRUNNER E.
A second example of a new precipitating anti Ag antibody.
Vox Sang 1968, 14 : 230.

42 - BUTLER R. et BRUNNER E.
Further observations on human anti LDL antibodies.
Serological behavior, frequency and mode of formation.
Vox Sang 1969, 17 : 230.

43 - BUTLER R. et BRUNNER E.
Inability of Ag/anti Ag complexes to fix complement and its significance.
Vox Sang 1969, 17 : 462.

44 - BUTLER R., BRUNNER E., MORGANTI G., VIERUCCI A., SCALOUMBACAS N. et POUTIS N.
A new factor of the Ag system Ag (g).
Vox Sang 1970, 18 : 85.

45 - BUTLER R., BRUNNER E., SCALOUMBACAS N., POLITIS E., MORGANTI G. et VIERUCCI A.
Ag (d), a further factor of the Ag system.
Vox Sang 1970, 18 : 90.

46 - BUTLER R. et BRUNNER E.
A new interpretation of the serum factor Ag (e).
Vox Sang 1970, 18 : 370.

47 - BUTLER R., MORGANTI G. et VIERUCCI A.
Serology and genetics of the Ag system.
Prot. Biol. Fluids, 1971, 19 : 161.

48 - BUTLER R., BRUNNER E., MORGANTI G., VIERUCCI A., HRUBISKO M. et GALIKOVA J.
Ag (h) an additional factor of the Ag system.
Vox Sang 1973, 24 : 267.

49 - CONTU L.
Un nouvel antigène des β lipoprotéines humaines.
Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1966, 6 : 671.

50 - CONTU L.
A new inherited serum beta-lipoprotein antigen in man and its relation to the Ag (xy) systems.
Vox Sang 1968, 15 : 367.

51 - CORNWELL D. G. et KRUGER F. A.
Molecular complexs in the isolation and characterization of plasma lipoprotein.
J. Lipid res. 1961, 2 : 110.

52 - CSIZMAS L.
Préparation of formalinized erythrocytes.
Proc. soc. exp. biol. med. 103, 1, 157 - 1960.

53 - DAUSSET J., CONTU L., FEINGOLD N. et BARGE A.
Indépendance du système d'histocomptabilité HL-A et des systèmes de groupes des beta-lipoprotéines Lp et Ag.
Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1968, 8 : 868.

54 - DURWALD W., LEOPOLD D. et KRAMER K. H.
The formation of precipitating antibodies after multiple pregnancies.
Vox Sang 1965, 10 : 94.

55 - GESERICH G. et BUNDSCHUH G.
Deutsch Gesundh Wes. 18, 1668, 1963.

56 - GODAL T.
Photometric country of formalinized erythrocytes.
Acta Path. Microb. Scand. 68 : 243, 1966.

57 - GRABAR P. et WILLIAM C. A.
Méthode permettant l'étude conjugée des propriétés électrophoretiques et immuno chimiques d'un mélange de protéines. Application sur serum sanguin.
Bioch. Biophys. Act. 1953, 10, 1 : 193.

58 - GYORGY P. et WITEBSKYE.
Anaphylaxie durch Bildung von serum isoantikörpen nach wiederholten.
Münch med. Wschr. 76, 195, 1929.

59 - HAVEL R. D., EDER H. A. et BRAGDON J. H.
Composition of serum lipoproteins.
J. Clin. Invest. 1956, 34 : 1345.

59 bis - HEIKEN A., HIRSCHEFELD J. et HAUGE M.
Segregation and linkage analyses of twelve blood and serum groups systems.
Human Heredity 19 : 419, 432, 1969.

60 - HJERTEN S.

Calcium phosphate chromatographie of normal human serum and of electrophoretically isolated serum proteins.

Bioch. Biophys. Acta 31 : 216, 1959.

61 - HIRSCHFELD J.

Investigations of a new anti Ag antiserum with particular reference to the reliability of Ag typing by micro-immuno-diffusion tests in agar gel.

62 - Hirschfeld J. et Blomback M.

A new anti Ag serum (L. L.)

Nature 1964, 201 : 1337.

63 - HIRSCHFELD J., BLUMBERG B. S. et ALLISON A. C.

Relationship of human anti-lipoprotein allotypic sera

Nature 1964, 202 : 706.

63 bis - HIRSCHFELD J.

Ag system.

Proc. 2nd Scand. Meeting of Forensic Med. Oslo 1964, 141, 15

64 - HIRSCHFELD J., UNGER P. et RAMGREN O.

A new anti Ag serum (serum B. N.)

Nature 1966, 212 : 206.

65 - HIRSCHFELD J.

The current status of lipoprotein variation demonstrable with isoprecipitin sera.

Int. Lp Arbeistatgung Marburg Lahn 1966, ed. Prof. Wendt GG.

66 - HIRSCHFELD J., CONTU L. et BLUMBERG B. S.

Anti-lipoprotein Nuoro serum (C. P.) and its relation to

sera C. de B. and L. L.

Nature 1967, 214 : 495.

67 - HIRSCHFELD J.

The Ag system. Comparaison of different isoprecipitin sera.

Series hemat. 1968, 1 : 38.

68 - HIRSCHFELD J. et RITTNER C.

Inheritance of the Ag (x), Ag (y), Ag (a1) and Ag (z) antige

Vox Sang 1969, 16 : 146.

69 - HIRSCHFELD J.

The Ag system. Present concepts and immunogenetic model.

Prot. Biol. Fluids 1971, 19 : 157.

70 - HUMMEL K.

Personal communication.

71 - JACOBS L. et LUNDE M. N.

Hemagglutination test for toxoplasmosis.

Sc. 125, 1035 - 1957.

72 - KABAT E. A. et MAYER M. M.

Exp. Immuno. . 2nd ed. Charles C. Thomas Springfield

1961 p. 798.

73 - LINDGREN F. T. et NICHOLS A. V.

The plasma proteins. Structure and fonction of human serum

lipoproteins.

The Plasma Proteins ed. F. W. Putnam vol. 2, 11 - 1960.

74 - LEVENE C., BLUMBERG B. S., VIERUCCI A. et RAGAZZINI F.

Incidence of antibodies against β lipoproteins (Ag system)

and the factors influence isoimmunisation on transfused patients in the USA and Italy.
Lancet 1967, 2 7516 582.

75 - MANCINI G., VAERMAN J. P., CARBONARA A. O. et HEREMANS J. F.
A single Radial diffusion method for the immunolegical quantitative of proteins.
Proteins of the biol. Fluids 11 coll. Bruges 1963 p. 370.

76 - MARIE P. L.
Accidents seriques chez l'homme consécutifs à l'injection intra veineuse de serum humain.
Compte Rendu Soc. biol. 79 149, 1916.

77 - MONN E., BERG K., REINSKOU T. et TEISBERG P.
Serum protein polymorphisms among Norvegian Lapps.
Studies on the Lp, Ag, Gc, and transferrin systems.
Hum. Hered. 1971, 21 : 134.

78 - HIRSCHFELD J., CONTU L. et BLUMBERG B. S.
Anti-lipoprotein Nuoro serum (C. P.) and its relation to sera C. de B. and L. L.
Nature 1967, 214 : 495.

78 bis - MORGANTI G., BEOLCHINI P. E., VIERUCCI A. et BUTLER R.
Contribution to the genetics of the βlipoproteins in man : I frequency, transmission and penetrance of factors Ag (x) and Ag (y).
Humangenetik 1968, 5 : 98.

79 - MORGANTI G., BEOLCHINI P. E., BUTLER R. et VIERUCCI A.
Contribution to the genetics of serum βlipoproteins in man :

II Frequency, transmission and penetrance of the Ag (a1) factor and its linkage with the Ag (x) and Ag (y) factors. Humangenetik 1968, 5 : 98

80 - MORGANTI G., BEOLCHINI P. E., VIERUCCI A. et BUTLER R. Contribution to the genetics of the serum βlipoproteins in man : III Lack of association and linkage between the Ag (x, y, a1) factors and some blood and serums antigens. Humangenetik 1968, 6 : 275

80 bis - MORGANTI G., BUTLER R., et VIERUCCI A. Lack of association and linkage between βthalassemia and some serums proteins systems (Gm, Imv, Hp, Gc, et Ag). Humangenetik 7, 236, 1969.

81 - MORGANTI G., BEOLCHINI P. E., BUTLER R., BRUNNER E. et VIERUCCI A. Contribution to the genetics of serum βlipoproteins in man : IV Evidence for the existence of the Ag $^{a1/d}$ and Ag $^{c/z}$ loci, closely linked to the Ag $^{x/y}$ locus. Humangenetik 1970, 10 : 244

82 - MORGANTI G., BEOLCHINI P. E., BUTLER R., BRUNNER E. et VIERUCCI A. Contribution to the genetics of serum βlipoprotein in man : VI Evidence for the existence of the Ag $^{t/z}$ locus closely linked to the Ag $^{x/y}$, Ag $^{a1/d}$, Ag $^{c/g}$ loci. Humangenetik 1972, 16 : 307.

83 - OKOCHI K. Serum lipoprotein allotypes Ag (x) and Ag (y) in Japanese. Vox Sang 1967, 13 : 319.

84 - OUCHTERLONY O.

In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphteria bacteria.

Acta path. microb. Scand. 25, 186, 1948.

84 bis - PEARSON S., STERN S., MAC GAVACK T. A.

Méthode rapide et précise de dosage du cholesterol sérique total.

Analyt. chem. 1953, 25, 813.

85 - PERSSON I. et SWAN T.

Serum βlipoprotein polymorphism in Grennlanders, frequency of the Ag (x) factor.

Human Hered. 1971, 21 : 384.

86 - RAY B. R., DAVISSON E. O. and CRESPI H. L.

J. Phys. Chem. 58, 841, 1954.

87 - SCHEIDEGGER J.

Une microméthode de l'immunoélectrophorèse.

Int. Arch. Allergy appl. Immuno. 7, 103, 1955.

88 - SOLAAS M. H.

Frequency of the Ag (x) antigen in a Norwegian population sample.

Human Hered. 1970, 20 : 290.

89 - SOLAAS M. H., STAVEM P. et BERG K.

Antibodies to serum lipoproteins antigens ans Australia SH antigen in multiply transfused patients.

Scand. J. Haemat. 1970, 7 : 233.

90 - STAVITSKY A. B.

Microméthode pour l'étude des protéines et des anticorps I

J. Immun. mai 1954, 72, 5 : 360.

91 - STAVITSKY A. B. et ARQUILLA

Microméthodes pour l'étude des protéines et des anticorps II

J. Immun. 74, 306, 1955.

92 - STAVITSKY J. F. et ACKROYD

Immun. Methods ed. R. Davis co Philadelphia 1964 p. 363.

93 - VIERUCCI A., MORGANTI G., VARONE D. et BORGATTI L.

New anti beta-lipoproteins sera in transfused children with thalassemia.

Vox Sang 1966, 11 : 427.

94 - VIERUCCI A. et Coll.

Isoantibodies to inherited types of β lipoprotein and immunoglobulins (Gm and Inv).

J. Pediat. 72 : 776 1968.

95 - VIERUCCI A., BLUMBERG B. S. et MORGANTI G.

Co-occurence of anti- Ag and anti Australia antibodies in transfused patients. Possible errors in typing.

Vox Sang 1970, 19 : 425.

96 - WALL R. L., JAYNE M. and BEAUCHAMP J.

Conservation de l'agglutination spécifique des globules [illegible] humains.

J. Lab. Clin. med. 36, 378, 1950.

97 - WINZLER R.

Glycoproteins.

The Plasma proteins : ed. FW Putman vol. 1 p. 309, 347.

Vu, le Président de Thèse

M. le Professeur J. P. SOULIER

Vu, le Doyen de la Faculté

NECKER - ENFANTS MALADES

M. le Professeur JEROME

Vu et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

R. MALLET